

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年11月1日 (01.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/81927 A1

(51) 国際特許分類⁷: G01N 33/569

745-8648 山口県徳山市御影町1番1号 Yamaguchi (JP).
学校法人 日本大学 (NIHON UNIVERSITY SCHOOL
JURIDICAL PERSON) [JP/JP]; 〒102-8275 東京都千
代田区九段南四丁目8番24号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03502

(22) 国際出願日: 2001年4月24日 (24.04.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-124070 2000年4月25日 (25.04.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
トクヤマ (TOKUYAMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒

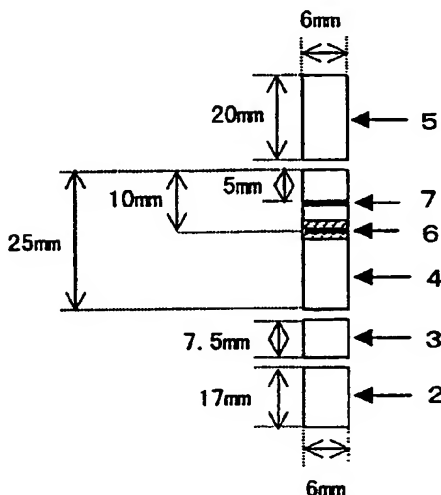
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平田広一郎 (HIRATA, Kouichirou) [JP/JP]; 〒305-0047 茨城県つくば市千現1-23-2 センチュリー時計台Ⅲ-203 Ibaraki (JP).
宇梶文緒 (UKAJI, Fumio) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代3-25-3-103 Ibaraki (JP). 松重浩司 (MATSUSHIGE, Koji) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県つくば市花畑1-15-2-511 Ibaraki (JP). 羽生尚広 (HANYU, Naohiro) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県つくば市二の宮4-8-3-5-101 Ibaraki (JP). 福島和雄 (FUKUSHIMA, Kazuo) [JP/JP]; 〒270-0157 千葉県流山市平和台5-36-23 Chiba (JP).

/続葉有/

(54) Title: METHOD OF DETECTING STREPTOCOCCUS SOBRINUS AND ANTIBODY THEREFOR

(54) 発明の名称: ストレプトコッカス・ソブリヌスの検出方法及びそのための抗体



(57) Abstract: A method of immunologically assaying *Streptococcus sobrinus* which participates in tooth decay; and an antibody and a diagnosis kit to be used in this method. As the antibody, use is made of an antibody having an ability to bind to *S. sobrinus* at a strength 100 times or more higher than to *S. mutans*.

(57) 要約:

齲蝕に関与するストレプトコッカス・ソブリヌスの免疫学的な測定方法及び該方法に用いる抗体、診断キットが提供される。抗体として、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能が、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の100倍以上である抗体が用いられる。

WO 01/81927 A1



- (74) 代理人: 弁理士 小田島平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.); 〒107-0052 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告

(81) 指定国 (国内): JP, US.

- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR). 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

ストレプトコッカス・ソブリヌスの検出方法及びそのための抗体

5 技術分野

本発明は、ストレプトコッカス・ソブリヌス (Streptococcus sobrinus) (以下、StreptococcusをS.と略記する場合あり) の免疫学的な測定方法、該測定による齲蝕の危険度の診断方法、並びにこれらの方法に使用できる抗体及び手段に関する。

10 背景技術

一般に、ミュータンスレンサ球菌 (mutans streptococci) と呼ばれる一群の乳酸発酵性細菌が、齲蝕発症に深く関わっていることが知られている。そして、人の口腔内におけるミュータンスレンサ球菌の存在量を調べることにより齲蝕危険度の判定を行なうことが行われておりそのための測定キットも市販されている。ミュータンスレンサ球菌の唾液中の濃度が $10^5 \sim 10^6$ 個/mlの場合には、齲蝕の危険があり、 10^6 個/ml以上の場合には特に危険であると言われている。

これらミュータンスレンサ球菌群は、ストレプトコッカス・クリセタス (S. cricetus、血清型a)、ストレプトコッカス・ラッタス (S. rattus、血清型b)、ストレプトコッカス・ミュータンス (S. mutans、血清型c、e、f)、ストレプトコッカス・フェルス (S. ferus、血清型c)、ストレプトコッカス・マカカ (S. macacae、血清型c)、ストレプトコッカス・ソブリヌス (S. sobrinus、血清型d、g)、ストレプトコッカス・ドウネイ (S. downey、血清型h) として、血清学的、遺伝学的に異なる7種の型に分類されている。

ところで、これらミュータンスレンサ球菌の中でヒトの口腔に存在するのは主にストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの2菌種であることが明らかとなったことからこれら2種の菌がヒトの齲蝕原性プラ-

クを形成するミュータンスレンサ球菌として注目され、これら両菌の齲蝕に与える影響を比較する研究が行なわれるようになっている。その結果、(i)ストレプトコッカス・ミュータンスはヒト口腔から高頻度に分離されるのに対し、ストレプトコッカス・ソブリヌスは1〜3割程度のヒト口腔から分離され、両菌種の口腔内での存在比率が大きく異なること（浜田茂幸、医学細菌学、4：271-314, 1984.）、(ii)ストレプトコッカス・ミュータンスは歯面のくぼみや割れ目に齲蝕を生じるのに対しストレプトコッカス・ソブリヌスは歯面のくぼみや割れ目とともに平滑な面にも齲蝕を生じること（Madison, K. M. J. Dent. Res. 70:38-43, 1991.、Hirose, H. Caries Res. 27:292-297, 1993.）、(iii)ストレプトコッカス・ソブリヌスはストレプトコッカス・ミュータンスと比較して歯表面への吸着能が高いこと（van der Mei, HC. et al. Caries Res. 25:415-423, 1991.）、(iv)ストレプトコッカス・ソブリヌスの酸産生能はストレプトコッカス・ミュータンスよりも強いこと（de Soet, J. J., et al. Caries Res. 25:116-122, 1991.）等が明らかとなっている。

また、ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの分布と齲蝕罹患の相関を調べた疫学研究の結果、ストレプトコッカス・ソブリヌスとストレプトコッカス・ミュータンスの両菌種を保有している人は、ストレプトコッカス・ミュータンスのみを保有している人よりも齲蝕罹患率が有意に高いことを示す報告もなされている（Okada, T., et al. J. Dent. Res. 74:501, 1995.、Kohler, B., et al. Community Dent. Oral Epidemiol. 15:332-335, 1987.、Hirose, H., et al. Caries Res. 27:292-297, 1993.）。

上記のような報告例は、いずれもストレプトコッカス・ソブリヌスの齲蝕誘発能はストレプトコッカス・ミュータンスよりも強いことを示唆するものであり、このことから、齲蝕危険度の判定をより信頼性高く行なうためには、ミュータン

スレンサ球菌全体の濃度だけでなく、人の口腔内におけるストレプトコッカス・ソブリヌスの存否、及び多寡を知ることが重要と考えられる。しかしながら、従来の齲蝕危険度の診断はミュータンスレンサ球菌全体の濃度に基づくものであり、齲蝕危険性の指標として使用する目的でストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度を測定した例は知られていない。

また、ストレプトコッカス・ソブリヌス自体を測定することに関しては、下記①～⑤に示すようにストレプトコッカス・ソブリヌスに特異的に結合するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いた免疫学的測定方法によりストレプトコッカス・ソブリヌスを測定した例が幾つか報告されているが、これら方法は培養、コロニー分離等の煩雑な操作を経て分離されたストレプトコッカス・ソブリヌスを測定する方法（下記①～③）であるか、又はこのような培養操作を経ずに被検体液から直接測定する方法である場合には、高感度の測定を行なうために煩雑な操作を要する特殊な検出方法を採用しなければならない方法（下記④）であるか或いは高感度の測定ができない方法（下記⑤）であるかであり、齲蝕危険度を診断するための汎用的な測定方法として適しているとは言えない。

①バシトラシンを入れたミチス・サリバリウス培地（MSB培地）を用いた培養により得られたコロニーについて、糖発酵試験等の生化学的方法、血清型特異的抗体を用いる免疫学的方法等によりコロニーを同定することでストレプトコッカス・ソブリヌスを個別に測定する方法（Okada, T., et al. J. Dent. Res. 74:501, 1995.、Kohler, B., et al. Community Dent. Oral Epidemiol. 15:332-335, 1987.、Hirose, H., et al. Caries Res. 27:292-297, 1993.）。なお、該方法はストレプトコッカス・ソブリヌスと齲蝕との関係を調べる疫学研究において最も一般に採用される方法である。

②ストレプトコッカス・ソブリヌスに特異的なポリクローナル抗体を他のミュータンスレンサ球菌で吸収処理することによりストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合選択性を高めたポリクローナル抗体を用いる各種標準菌株（ref

erence strain) や臨床分離株 (唾液や歯垢から培養法により分離された単一の菌) の測定方法 (例えば Ota, F. et al., Zbl. Bakt. Hyg. A 265: 330-339, 1987. および Bratt hall, D., Odont. Revy. 23: 181-196, 1972.)。なお、
5 ポリクローナル抗体を他の菌で吸収処理することは、目的とする抗原に対する結合選択性 (または反応性倍率とも称されている: 目的とする抗原に対する結合能 (binding ability) と他の抗原に対する結合能の割合) を高めるための手段であり、上記 Ota, F. et al. の方法では、ストレプトコッカス・ソブリヌス血清型 d 及び g 株に特異的なポリクローナル抗体をそれぞれ取得し、ストレプトコッカス・ミュータンスで吸収処理することによりストレプト
10 コッカス・ミュータンスに対する結合能とストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能の比が高められたポリクローナル抗体が得られている。しかし、いずれのポリクローナル抗体においても上記結合能の比は吸収処理に用いたストレプトコッカス・ミュータンス菌の結合能に対して約 18~26 倍、全ストレプトコッカス・ミュータンス菌の平均結合能に対して 15~19 倍程度である。また、前
15 記 Bratt hall の方法では、ポリクローナル抗体はストレプトコッカス・ソブリヌス血清型 d の標準菌を動物に免疫して得られた抗体に、血清型 a の菌 (即ちストレプトコッカス・クリセタス) による吸収処理を施しているが、ストレプトコッカス・ソブリヌスと他のミュータンスレンサ球菌に対する結合能については特に検討されていない。

③ストレプトコッカス・ソブリヌスのモノクローナル抗体を使用して唾液や歯垢中のストレプトコッカス・ソブリヌスについて一旦培養し菌体濃度を高くしてから測定する方法 (de Soet, J. J., J. Clin. Microbiol. 28: 2467-2472, 1990.)。なお、該文献には、上記モノ
25 クローナル抗体結合能が弱く蛍光抗体法により歯垢中のストレプトコッカス・ソブリヌスを直接検出できないことが記載されている。

④ポリクローナル抗体を使用した蛍光抗体法によりストレプトコッカス・ソブリヌスを測定する方法 (Walter, J., J. Dent. Res. 55: A

87-A93, 1976.、Babaahmady, K. G., Caries Res. 32:51-58, 1998.)。該方法は培養操作を必要としないものの、蛍光顕微鏡といった特別な装置を用い目視でストレプトコッカス・ミュータンスに結合したものとストレプトコッカス・ソブリヌスに結合したものとを蛍光の強弱で判別するという煩雑な手技を必要とするものである。

⑤ストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体を利用したラテックス凝集法により唾液や歯垢から直接ストレプトコッカス・ソブリヌスを測定する方法(武井勉、阪大医学雑誌、35:93-109, 1990.、Takei, T. Archs. oral. Biol. 37:99-104, 1992.、特開平1-250067.)。該方法における検出下限は 1×10^6 個/ml以上であり測定感度が不十分である。なお、一般に抗体として、動物に抗原として細菌を免疫することによって得られるポリクローナル抗体を用いて被検体液中の抗原細菌を測定する場合には、細菌の抗原性が一般に強いことから、その結合力は一般に高く、例えば 10^5 個/ml程度の細菌濃度を有する被検体液中の細菌を検出することは比較的容易であると考えられ、例えば該方法で採用しているのと同様なポリクローナル抗体を利用したラテックス凝集法においても 10^5 個/mlの細菌を検出した例は多く知られていたにもかかわらずストレプトコッカス・ソブリヌスに関する上記方法では十分な感度を得られていない。これは、培養、コロニー分離等の操作により他の菌を除去していないため、用いたポリクローナル抗体が他のミュータンスレンサ球菌との交差反応を起こしてしまい、ラテックス凝集法に適用する抗体量を多くできなかった(使用する抗体量を増加すると、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する反応が検出されてしまう)のが原因ではないかと考えられる。

齲蝕の危険度の存否を診断するための汎用的な測定方法としては、唾液又は歯垢から直接調製した臨床検体がそのまま使用でき、しかも簡便な操作で、例えば 10^5 個/mlレベルの濃度のストレプトコッカス・ソブリヌスを検出することができる程度に高感度な測定が行なえることが重要と考えられるが、上述したようにこのような要求を満足するストレプトコッカス・ソブリヌスの測定方法は知

られていないのが現状である。

そこで、本発明は、口腔内から採取された唾液や歯垢から直接調製されたストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスを含み得る被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを、培養操作等の煩雑な操作を行なうことなく、迅速且つ簡便にしかも高感度で測定する方法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、検出感度があがらない原因の一つに被検体液中に存在する口腔内レンサ球菌等の夾雑物の影響があると考え、多種存在する口腔内レンサ球菌の中でも特にストレプトコッカス・ミュータンスに着目し、その影響について検討を行なった。具体的には、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性とストレプトコッカス・ミュータンスに対する反応性との比が異なる抗体を作製し、該反応性の比と検出感度について種々検討を行なった。

この検討を通して、本発明者等によって始めて取得されたストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の100倍以上である高感度な抗体を用いた場合には、被検体液中に存在するストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度が 10^5 個/ml程度でもストレプトコッカス・ソブリヌスを検出、定量することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

従って、本発明として、ストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを含むことが疑われる被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスの検出方法であって、

- (A) ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の100倍以上である抗体を用意すること、
 - (B) 該抗体を被検体液と接触させて免疫複合体を形成すること、並びに
 - (C) 該免疫複合体を測定すること、
- を含んでなる方法、が提供される。

また、別の態様の本発明として、被験者における齲蝕の危険度の診断方法であっ

て、

(a) 被験者からの唾液及び／又は歯垢に由来する被検体液を調製すること、

(b) ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の100倍以上である抗体（S抗体）を用意すること、

(c) 段階（a）で調製した被検体液と段階（b）で用意した抗体とを接触させて免疫複合体を形成すること、並びに

(d) 該免疫複合体を測定し、その多寡を齲蝕の危険度の存否の指標として評価すること、

10 を含んでなる診断方法、も提供される。

また、さらなる態様の本発明として、上記診断方法において、段階（c）を該抗体（S抗体）の他にストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体（M抗体）の共存下に実施するか、或いは段階（c）に加え、S抗体をM抗体に代えて実施すること以外は段階（c）と同様の操作を実施し、こうして
15 形成されるM抗体に由来する免疫複合体も測定し、該複合体の多寡も齲蝕の危険度の存否の指標として評価する方法も提供される。

また、さらなる別の態様の本発明として、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の100倍以上である抗体、さらに必要により、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して
20 特異的に結合する抗体、又はストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して特異的に結合する抗体（MS抗体）を含んでなる免疫学的測定用キット又は被験者における齲蝕の危険度の診断用キット、も提供される。

また、さらなる別の態様の本発明として、被検体液を一時的に吸収しそして保持するためのサンプルパッド、標識抗体を一時的に保持するためのコンジュゲートパッド、並びに検出用抗体が固定化され、前記サンプルパッドに一時的に吸収しそして保持された被検体液および該被検体液に随伴して前記コンジュゲートパッドより流出した標識抗体が展開される展開メンブレンがこの順番で接合された免
25

疫クロマトストリップにおいて、前記検出用抗体としてストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の100倍以上である抗体を用いることを特徴とする免疫クロマトストリップも提供される。

- 5 また、さらなる別の態様の本発明として、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の100倍以上であるポリクローナル抗体も提供される。

10 上記本発明に従う方法によれば、後述する実施例で示されるように、免疫学的測定方法により唾液や歯垢中のストレプトコッカス・ソブリヌスを培養すること無しに直接測定することが可能となる。このような測定が可能となったのは、本発明者等によって高感度測定に要求される抗体の特性が明らかにされ、該特性を満足する新規な抗体が見出されたことによる。

15 本発明の方法においては、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体を併用することにより、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量とストレプトコッカス・ミュータンス量とを同時に測定することが可能となり、また、ストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して特異的に結合する抗体を併用することにより、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量とストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量とを同時に測定することが可能となる。

20 上記本発明のキット又はストリップにおいて、場合によって、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体、又はストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して特異的に結合する抗体を含めることができ、こうすることにより、これらのキット又はストリップは
25 ストレプトコッカス・ソブリヌス量と、ストレプトコッカス・ミュータンス量又はストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌス総量とを同時に測定することが可能となる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の免疫クロマト法で使用するストリップの各部材の概略図を示

すものである。図中、2はサンプルパッドを、3はコンジュゲートパッドを、4は展開メンブレンを、5は吸収パッドを、6は検出ラインを、そして7は、コントロール判定ラインを表す。

図2は、上記図1に示すストリップの側面図である。

- 5 図3及び4は、本発明の免疫クロマト法で使用するM抗体又はMS抗体を併用したストリップの各部材の概略図である。図中の数字は、図1のものに準ずる。
発明を実施するための最良の形態

本発明の方法では、ストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを含むことが疑われる被検体液に含まれるストレプトコッカス・ソ
10 ブリヌスが測定できる。かような被検体液は、天然及び人工のいかなるものであってもよいが、通常、唾液又は歯垢から、必要により、溶解又は希釈もしくは濃縮して調製された液状試料である。

ここで、ストレプトコッカス・ソブリヌスとは、ミュータンスレンサ球菌群の内で、菌体表層多糖抗原の構造により血清型がd型及びg型に分類される菌のい
15 ずれか又は両者を意味する。血清型がd型の標準菌株としては、B13、OMZ176等の菌株が、血清型がg型の標準菌株としては、6715、OMZ65等の菌株が例示される。

また、ストレプトコッカス・ミュータンスとは、ミュータンスレンサ球菌群の内で血清型がc、e、及びf型に分類される菌を意味する。血清型がc型の標準
20 菌株としてIngbritt、MT6R等の菌株が、血清型がe型の標準菌株としてLM7、P4等の菌株が、血清型がf型の標準菌株としてSE11、OMZ175等の菌株がそれぞれ例示される。

本明細書に記載される標準菌株は、それぞれ一般的な標準菌株として従来より広く認識され、広範に且つ汎用的に使用されていることから（例えば、Ono,
25 T. et al., J. Med. Microbiol. 41:231-235, 1994. およびPerch, B., Acta. path. microbiol. scand. 82:357-370, 1974. およびBratthall, D., Odont. Revy. 21:143-152, 1970.）、ストレプ

トコッカス・ミュータンスについては血清型 c の標準菌株として *I n g b r i t*
t が、血清型 e の標準菌株として P 4 が、血清型 f の標準菌株として OMZ 1 7
5 が、また、ストレプトコッカス・ソブリヌスについては血清型 d の標準菌株と
して B 1 3 が、血清型 g の標準菌株として 6 7 1 5 が好適に使用できる。これら
の標準菌株は、例えば、上記 O t a, F. e t a l. に記載されている公的機
関等から比較的容易に入手できる。

本発明の検出方法によれば、ストレプトコッカス・ソブリヌス濃度が 10^5 個
/m l 以上の被検体液についてストレプトコッカス・ソブリヌスの検出が可能で
ある。なお、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス濃度（濃度の単位：
10 個/m l）は、培養法等の従来公知の細菌学的手法に従い、ストレプトコッカス・
ソブリヌスを計数することによって測定出来る。例えば、培養法により濃度測定
をする場合には、被検体液を適宜希釈して得た懸濁液に超音波処理等の菌体の分
散処理を施した後、ブレインハートインフュージョン（以下、「B H I」と表記
することもある）培地プレート上に塗布し生じるストレプトコッカス・ソブリヌ
15 スのコロニー数を計数し、被検体液の希釈倍率を乗じることにより、被検液中
のストレプトコッカス・ソブリヌス濃度（濃度の単位：個/m l）を測定するこ
とが出来。但し、このとき、被検液中に、ストレプトコッカス・ソブリヌス
以外にもストレプトコッカス・ミュータンス、或いは他の口腔内細菌が含まれる
場合には、培地プレート上に生じたコロニーはストレプトコッカス・ソブリヌス
20 のコロニーとストレプトコッカス・ソブリヌス以外のコロニーに精確に分類され、
ストレプトコッカス・ソブリヌスだけを正確に計数する必要がある。コロニーの
分類は、培地プレート上に生じたコロニーについて、糖発酵試験等の生化学的手
法、特異的抗体を利用した免疫学的手法、DNAプローブを利用した遺伝学的手
法により行なうことができる。

25 本発明の方法で使用する被検液中のストレプトコッカス・ミュータンス濃度
は特に限定されないが、ストレプトコッカス・ソブリヌスの検出感度の観点から
 $0 \sim 10^8$ 個/m l、特に $10^5 \sim 10^7$ 個/m l であるのが好適である。該濃度
は、ストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度と同様にして測定することができる。

本発明の方法で使用する被検体液は、特に、齲蝕の危険度を診断するための対象としては、唾液又は歯垢を含む被検体液が特に好適に使用される。また、被検体液の調製が容易であるという観点から、培養操作を行わずに唾液又は歯垢から直接調製した被検体液が特に好適に使用できる。なお、唾液及び歯垢は、被検
5 体液中にそれぞれ単独で含まれていてもよいし、混合物として含まれていてもよい。

例えば歯垢のみを含む被検体液は、口腔内をうがい等により洗浄し唾液成分を除去した後に採取した歯垢を用いて調製すればよい。歯垢の採取は、口腔内の特定部位の歯垢をつまようじ、綿棒、スパチュラ等の従来公知の方法で採取すること
10 とも出来るし、口腔内より無作為に採取することも出来る。このように採取された歯垢を液体に懸濁し被検体液とすればよい。該液体としては、水性液体であれば特に限定されず、例えば精製水、生理食塩水、又は従来公知の各緩衝液が使用可能であるが、抗原抗体反応を一定の条件下で最適に行うために緩衝液を使用することが特に好ましい。緩衝液としては、pH 6.0からpH 8.0に緩衝能を
15 有する従来公知の緩衝液が何ら制限無く使用可能であり、例えばリン酸緩衝液、トリス緩衝液、HEPES等のグッドの緩衝液類、或いはホウ酸緩衝液等が使用可能である。また、液体の量としては、歯垢1mgに対して0.1~10mlの液体を用いれば歯垢を均一に懸濁することが出来るが、一般に「齲蝕の危険性あり」と診断される場合の歯垢中及び唾液中のストレプトコッカス・ソブリヌス濃
20 度はそれぞれ 10^5 （個/mg湿歯垢）及び 10^5 （個/ml唾液）であることから、齲蝕危険度の診断を行なう場合には唾液をそのまま被検体液として用いた時との対応を考慮すると、歯垢1mgに対して1mlの液体を用いるのが最も好適である。歯垢を含む被検体液はそのままでも使用可能であるが、歯垢を分散させる目的で超音波処理を施す、ガラスビーズ等の破砕剤と混合し攪拌する等の、従
25 来公知の処理を行ったものを被検体液とすることが好適である。

また、唾液のみを含む被検体液は、スポイト、ピペット等の従来公知の方法で採取された唾液を用いて調製することが出来る。採取された唾液は、そのまま或

いは、上記水性液体で適宜希釈して被検体液とすればよい。測定感度の点からは採取した唾液をそのまま被検体液とするのが好適である。

齲蝕の危険を有する人から採取した歯垢または唾液中には、通常、 $10^5 \sim 10^7$ (個/mg 湿歯垢) または $10^5 \sim 10^7$ (個/ml 唾液) のストレプトコッカス・ソブリヌスが含まれている。

本発明の方法では、上記のような被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能とストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の比率 (ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能をストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能で除した値。以下、「S/M結合選択性」ともいう。) が100以上であり、且つストレプトコッカス・ソブリヌスとの免疫複合体が通常の免疫学的測定を行う上で十分な安定性を保持できる結合能を有する抗体を用いて免疫学的測定方法により測定する。

ここで、抗体とは、抗体のグロブリンクラスは限定されず、現在知られているどのようなグロブリンクラスのものも含まれる。また、通常の抗体分子のみならず、該抗体の部分分解物 (Fab、Fab'、Fab'2等)、及び該抗体の活性フラグメント (抗体の抗原認識部位) が存在する部分構造等も含まれる。

また、抗体のS/M結合選択性が100以上であるとは、酵素免疫測定法 (以下、「ELISA法」と略すこともある)、放射免疫測定法等の従来公知の定量性の高い免疫学的測定方法により、ストレプトコッカス・ソブリヌスとストレプトコッカス・ミュータンスを抗原とし、抗原抗体反応の検出を行った際に、ストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として使用した場合に検出される結合能が、ストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に検出される結合能の100倍以上あることを指す。結合能の指標は、上記免疫学的測定法により抗原抗体反応により形成される免疫複合体の検出を行った際の測定値 (または反応値ともいう) を用いてもよいし、抗原抗体反応に関与する抗原量すなわち菌体量を用いてもよい。

抗体のS/M結合選択性は、同一菌体量のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを抗原とし、抗原抗体反応を行った場合に、

ストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として使用した場合に検出される反応値をストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に検出される反応値で除することにより求めることが出来る。例えば、放射免疫測定法により各
5 10^7 個/mlのストレプトコッカス・ソブリヌスとストレプトコッカス・ミュータンスを抗原とし、免疫複合体の検出を行った際に、ストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として使用した場合に検出される反応値が100であり、ストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に検出される反応値が1である場合、S/M結合選択性は100である。

或いは、ストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に、同一の反応値が検出される抗原量（菌体量）を比較して求めることも可能である。例えば、ELISA法によりストレプトコッカス・ソブリヌスとストレプトコッカス・ミュータンスを抗原とし、免疫複合体の検出を行った際に、 10^6 個/mlのストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として使用した場合に検出される測定値が1.0であり、 10^8 個/mlのスト
15 レプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に検出される測定値が0.9である場合、S/M結合選択性は100以上である。

抗体の各菌体に対する結合能（または反応性ともいう）は、標準菌株のリン酸生理食塩緩衝液（pH 7.4）（以下、「PBS」と略すこともある）懸濁液を被検体液として使用するELISA法により好適に測定することができる。この
20 とき標準菌株としては、ストレプトコッカス・ソブリヌスの血清型d及びgの菌として、それぞれ例えばB13及び6715が、また、ストレプトコッカス・ミュータンスの血清型c、e、及びfの菌として、それぞれ例えばIngbritt、P4、及びOMZ175が使用可能である。具体的手順としては、まず、特定濃度の標準菌株のPBS懸濁液を96穴イムノプレートの各ウェルに添加し吸着し
25 た後、ブロッキングを行い、次いで、イムノプレートにストレプトコッカス・ソブリヌスに対する抗体を添加後、例えば酵素標識した二次抗体を添加し、酵素活性を測定することにより抗体の各菌体に対する結合能を評価することが出来る。

また、競合ELISA法を用いて結合能を評価する場合には、それぞれ同一濃

度のストレプトコッカス・ソブリヌス標準菌株のPBS溶液を96穴イムノプレート
の各ウェルに添加し吸着した後、ブロッキングを行い、次いで、イムノプレ
ートにストレプトコッカス・ソブリヌスに対する抗体と、それぞれ一定量のスト
レプトコッカス・ソブリヌス或いはストレプトコッカス・ミュータンスの標準菌
5 株を混合して添加後、例えば酵素標識した二次抗体溶液を添加し、酵素活性を測
定することで、抗体の反応性を評価することが出来る。

S/M結合選択性が100未満の抗体を用いた場合には、高感度な測定ができ
ない。例えばS/M結合選択性が10の抗体を用いた場合に、 10^7 個/mlの
ストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として免疫複合体の検出を行った際の測
10 定値を100とすると、 10^6 個/mlのストレプトコッカス・ソブリヌスを抗
原として検出される測定値は10であるが、 10^7 個/mlのストレプトコッカ
ス・ミュータンスを抗原として検出される測定値も10である。すなわち、スト
レプトコッカスソブリヌスの存在量が0であっても 10^7 個/mlのストレプト
コッカス・ミュータンスが存在する場合にはストレプトコッカス・ソブリヌスが
15 10^6 個/mlあると判定してしまうことになる。

一般に、ストレプトコッカス・ソブリヌスの唾液中の濃度が 10^5 個/ml以
上の場合には「齲蝕の危険あり」と判断できることから、ストレプトコッカス・
ソブリヌス濃度が 10^5 個/ml以上を「齲蝕危険度陽性」と定義すると、上記
のようなS/M結合選択性が100未満の抗体を用いた場合には、その測定結果
20 により偽陽性と判断される被検体数が多くなりすぎ、齲蝕危険度の診断を目的と
した測定には適用できない。口腔内に存在し得るストレプトコッカス・ミュータ
ンスを勘案し、相当する免疫複合体の測定結果を齲蝕危険度の指標としたときに
偽陽性の発生率が小さいという観点から、S抗体のS/M結合選択性は500以
上、特に1000以上であるのが好適である。

25 本発明で使用するS抗体は、そのS/M反応性倍率が100以上であるもので
あれば特に限定されないが、抗体取得の容易さの観点からポリクローナル抗体で
あるのが好適である。

また、S抗体は、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスの全量を検出、

定量するためには、ストレプトコッカス・ソブリヌスの血清型 d 及び g 株に対する結合能が同等であることが好ましい。ここで、ストレプトコッカス・ソブリヌスの血清型 d 及び g 株との結合能が相互に同等であるとは、従来公知の免疫学的測定方法により、同一菌体量の血清型 d 及び g 株のストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原とし、抗原抗体反応の検出を行った際に、両者から検出される結合能比が相互に 2 倍以内、好ましくは 1.5 倍以内であることを指す。

さらに、S 抗体は、ストレプトコッカス・ソブリヌスとの免疫複合体が通常の免疫学的測定を行う上で十分な安定性を保持できる結合能を有する必要がある。ここで、「ストレプトコッカス・ソブリヌスとの免疫複合体が通常の免疫学的測定を行う上で十分な安定性を保持できる結合能」とは、一般的な免疫学的測定法の中のある特定の免疫学的測定法によりストレプトコッカス・ソブリヌスを測定する場合に、その測定方法においての類似した抗原（この場合、例えばストレプトコッカス・ミュータンスや他のレンサ球菌）について通常検出可能であると言われている菌体濃度のストレプトコッカス・ソブリヌスを検出することが可能となるような抗体の結合能のことを意味する。例えば、金コロイドを標識物質として用いた免疫クロマト法によりストレプトコッカス・ソブリヌスを測定する場合において、 10^5 個/ m l 以上の濃度のストレプトコッカス・ソブリヌスを検出可能とする抗体の結合能を意味する。

このような、結合能は、ストレプトコッカス・ソブリヌスの標準菌体を用いた直接 E L I S A 法における検出下限の菌体濃度として表すこともでき、ストレプトコッカス・ソブリヌスの標準菌体の懸濁液 $50 \mu \text{l}$ を試料とし、96 穴イムノプレートの各ウェルに菌体を固定化後、 50 ng /ウェルの抗体を用いて直接 E L I S A 法により測定を行なったときの検出下限の菌体濃度が 10^6 個/ m l 以上 (5×10^4 個/ウェル)、特に 2×10^5 個/ m l 以上 (10^4 個/ウェル)、である時には、ストレプトコッカス・ソブリヌスとの免疫複合体が通常の免疫学的測定を行う上で十分な安定性を保持できる結合能を有すると言える。

なお、上記直接 E L I S A 法における検出下限の菌体濃度とは、具体的には次のようにして決定される。

即ち、BHI液体培地中で6715（ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型g）及びB13（ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型d）を37℃、嫌気条件下で培養した後、培養液を遠心処理し上清の培地成分を除去し菌体沈殿を回収し、次いで、菌体沈殿をPBSにて洗浄後、PBSに再懸濁し、40wで20秒超音波処理を施した後、PBSにて $A_{600}=1.0$ に調整し、約 1×10^9 個/mlの菌体濃度の標準菌体懸濁液を得る。なお、この標準菌体懸濁液の菌体濃度は、適宜希釈した後にBHI培地プレート上に添加し、生じたコロニー数を計数し、希釈倍率を乗じて求めた値である。次いで、このようにして得た標準菌体懸濁液（ $A_{600}=1.0$ ）を、0.1M炭酸緩衝液（pH9.0）にて $1 \sim 1 \times 10^5$ 倍に希釈して10倍希釈系列を調製し、96穴イムノプレートの各ウェルに50 μ lずつ添加し、4℃、12時間放置し固定する。次いで、イムノプレートから菌体懸濁液を除去し、PBSにて各ウェルを洗浄後、ブロッキングを行った後、評価する抗体（一次抗体）のIgG濃度が1.0 μ g/mlとなるように1%のBSA及び0.05%のTween 20を含むPBS（pH7.4）を用いて希釈してからイムノプレートの各ウェルに50 μ lずつ添加し、37℃、1時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し洗浄する。その後、アルカリホスファターゼで標識した二次抗体（例えば一次抗体がウサギIgGの場合は、カッセル社製アルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgGポリクローナル抗体（カタログ番号：59652））を、1%のBSA及び0.05%のTween 20を含むPBS（pH7.4）にて10 μ g/mlとなるように希釈したものをイムノプレートの各ウェルに50 μ l添加し、37℃、1時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し洗浄する。そして最後に、発色基質溶液であるp-ニトロフェニルリン酸の2-エタノールアミン水溶液（例えばBIORAD社製発色基質溶液（カタログ番号：172-1063））を各ウェルに50 μ lずつ添加し、25℃、20分反応させた後に、0.4MのNaOHを各ウェルに50 μ lずつ添加し反応を停止し、各ウェルの405nmの吸光度及びバックグラウンドの吸光度を測定し、バックグラウンドと同等の吸光度を示すウェルに固定された菌体濃度を検出下限の菌体濃度とすることにより求めることができる。

本発明において、S抗体としては、S/M反応性倍率が1000以上であり、
ストレプトコッカス・ソブリヌスの血清型d及びg株に対する結合能比が相互に
2倍以内、特に1.5倍以内であり、上記検出下限の菌体濃度で表したストレプ
トコッカス・ソブリヌスに対する反応性が 10^6 個/ml以上、特に 2×10^5 個
5 /ml以上であるモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いるのが特に
好適であり、抗体取得の容易性を勘案すれば、この様な特性を有するポリクロー
ナル抗体を用いるのが最も好適である。

S抗体は、該抗体がポリクローナル抗体である場合には、免疫動物にストレプ
トコッカス・ソブリヌスの全菌体または該全菌体より得られる抗原抽出物を免疫
10 してストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体を得、次いで
得られた該ポリクローナル抗体からストレプトコッカス・ミュータンスとの交差
反応性を有するポリクローナル抗体を除去することにより好適に得る事ができる。

また、S抗体がモノクローナル抗体である場合には、上記のような抗原で免疫
した哺乳動物の脾細胞やリンパ細胞等の抗体産生細胞を分取し、分取した抗体産
15 生細胞とミエローマ細胞を融合して得たハイブリドーマについてS/M反応性倍
率が100以上の抗体を産生するハイブリドーマを選択し、選択されたハイブリ
ドーマの培養上清として製造する方法、或いは該ハイブリドーマを動物の腹腔内
に移植して増殖させて腹水を回収することにより得ることができる。なお、ここ
で、該ハイブリドーマの抗体遺伝子の全部または一部を導入した組換え体を培養
20 して調製された組換え抗体もモノクローナル抗体に含まれる。

以下、これら抗体の中でも取得が容易なポリクローナル抗体からなるS抗体の
取得方法について詳細に説明する。

ポリクローナル抗体からなるS抗体を取得する場合の免疫用の抗原としては、
ストレプトコッカス・ソブリヌスの血清型d株、或いは血清型g株の全菌体、こ
25 れら全菌体からの抽出抗原、又はこれらの混合物等が使用出来る。

全菌体としては生菌の他、ホルマリン処理、或いは加熱処理等された死菌、凍
結保存された菌体が使用可能である。

全菌体からの抗原の抽出は、抗原が多糖抗原である場合は、菌体懸濁液を加熱

- 処理する方法 (Rants, L. A., Stanford. Med. Bull. 13:290-291, 1955.)、亜硝酸により抽出する方法 (武井勉, 阪大医学雑誌. 35:93-109, 1990.) 等の従来公知の方法により行なうことができる。抽出された多糖抗原は、そのまま抗原として使用することも可能であるし、更に精製して使用することも出来る。また、抗原がタンパク抗原である場合には、アルカリ、塩、キレート剤、カオトロピックイオン、界面活性剤を使用して抽出する (武井勉, 阪大医学雑誌. 35:93-109, 1990.)、或いは菌体由来のタンパク質中に存在する特定のタンパク質を精製する (Okahasi, N. Microbiol. Immunol. 30:35-47, 1986.、Hamada, S. J. Gen. Microbiol. 135:335-344, 1989.) ことにより得ることができる。また、菌体の特定のタンパク質をコードする遺伝子の全部または一部を導入した組換え体を培養して調製された組換えタンパク質、特定のタンパク質のアミノ酸配列を基に合成された合成ペプチド等も抗原として使用できる。
- これらの抗原抽出物等は、抗原としてそのまま使用することも可能であるし、免疫用担体と結合させて使用することも可能である。担体としては、スカシガイのヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン (BSA)、ヒト血清アルブミン (HSA)、ニワトリ血清アルブミン、ポリ-L-リジン、ポリアラニルリジン、ジバルミチルリジン、破傷風トキソイド又は多糖類等の従来公知の担体が好適に使用可能である。
- 本発明で使用するポリクローナル抗体からなるS抗体を作製するために用いる抗原としては、操作性の簡便さから、菌体を直接、或いは多糖抗原の抽出物をそのまま使用するのが好適であり、更に、得られる抗体の力価が高いことから、ストレプトコッカス・ソブリヌスの全菌体を直接免疫するのが特に好適である。
- 上記のような抗原を免疫する動物としては、抗体取得のために一般的に使用される動物が使用可能であるが、マウス、ヤギ、ウサギ、モルモット等の哺乳動物を用いるのが好適である。これら動物に抗原を免疫する方法としては、従来公知の方法が制限なく採用でき、菌体または菌体抽出物を直接免疫してもよいし、ア

ジュバントを添加混合して免疫してもよい。例えば、菌体を直接免疫する場合には、ストレプトコッカス・ソブリヌスをBHI液体培地等で培養後に得られる菌体の懸濁液をそのまま使用することも可能である。また、アジュバントとしては、フロイントの完全アジュバント、フロイントの不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の従来公知のアジュバントが好適に使用可能である。

これら動物に抗原を免疫後、採血し血清を調製することで、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体を含む液体（以下、該液体を「抗血清」と表記する場合もある。）が得られる。

得られた抗血清は該抗血清中に含まれるポリクローナル抗体のS/M結合選択性が100以上であればそのままでも免疫学的測定方法に使用可能であるが、通常抗血清中にはストレプトコッカス・ソブリヌスに特異的な抗体以外に他の抗体、及びアルブミン等の抗体以外のタンパク質が含まれているため、高感度且つ特異的な測定を行なうためには、得られた抗血清を塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法、電気泳動法等の方法により処理することでポリクローナル抗体画分を分取することが好ましい。例えば抗原としてストレプトコッカス・ソブリヌスの菌体をウサギに免疫すると、約4週間後以降に抗血清が得られ、例えばプロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィー法によりポリクローナル抗体画分（IgG画分）が得られる。

この様にして得られたポリクローナル抗体についてS/M結合選択性を決定し、その値が100以上であれば、そのままS抗体として本発明の方法に使用できる。また、S/M結合選択性が100未満である場合には、得られたポリクローナル抗体（以下、「原料抗体」ともいう。）からストレプトコッカス・ミュータンスとの交差反応性を有するポリクローナル抗体（以下、「交差反応性抗体」ともいう。）を除去すればよい。

一般に、ポリクローナル抗体は多種の抗体の混合物であり、前記のようにして取得したポリクローナル抗体の中には、ストレプトコッカス・ミュータンスにも反応する抗体が同時に存在し、そのため全体としてのS/M結合選択性が低下し

ていると考えられる。したがって、全体としてのS/M結合選択性が100以上となるまで原料抗体から交差反応性抗体を選択的に分離除去すればよい。

但し、交差反応性抗体の中には、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する親和定数の高いものから低いものまで様々な結合力を有す抗体が含まれており、
5 原料抗体のS/M結合選択性を100以上とするためにはストレプトコッカス・ミュータンスに対する親和定数の高い抗体のみならず親和定数の低い抗体も除去することが必要である。本発明者らは、ストレプトコッカス・ミュータンス菌体をそのまま用いて交差反応性抗体を除去する方法において、1mgの原料抗体に対し40（OD₆₀₀）以上という高い割合でストレプトコッカス・ミュータンス
10 菌体を添加して吸収処理を行なうことによりS/M結合選択性を100以上とすることに成功したものである。本発明者等の検討によれば、同様の方法でS/M結合選択性が50及び90程度の抗体を得ようとする場合には、それぞれ1mgの原料抗体に対し約1（OD₆₀₀）及び約4（OD₆₀₀）の菌体を添加すればよいことが分かっており、S/M結合選択性が100以上の抗体を得るためには、原料
15 抗体に対して通常必要とされる菌体よりも著しく多量の菌体を使用しなければならないことが分かる。

原料抗体から交差反応性抗体を除去する方法は、特に限定されないが、アフィニティー精製法を採用するのが好適である。アフィニティー精製法により交差反応性抗体を分離する場合には、不溶性担体に固定化されたストレプトコッカス・ミュータンスの菌体または菌体由来の菌体表面抗原と、原料抗体とを接触させ、
20 該不溶性担体（「M抗原固定化担体」ともいう。）に交差反応性抗体を吸着させて該不溶性担体と共に分離すればよい。あるいは、ストレプトコッカス・ミュータンスの菌体を、不溶性担体を使用せずそのまま使用し原料抗体と接触させ、菌体に交差反応性抗体を吸着させて該菌体と共に分離することもできる。これらの
25 方法により、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能が低い或いは結合能を有さない抗体は、M抗原固定化担体あるいはストレプトコッカス・ミュータンスの菌体に吸着されないの、該担体あるいは該菌体と接触後、これと分離された抗体のS/M結合選択性は高くなる。

不溶性担体を使用する場合の、不溶性担体としては、アガロース、デキストラン、セルロース、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、塩化ビニル、ガラス、シリコンラバー、又は多孔性シリカビーズ等の従来公知の担体は何ら制限無く使用可能である。また、これら担体にストレプトコッカス・ミュータンスの菌体あるいは菌体由来の菌体表面抗原を固定化する方法としては、臭化シアン活性化法等の化学的結合法や、物理化学的吸着性を利用した方法は何ら制限無く使用可能である。

ストレプトコッカス・ミュータンスの菌体をそのまま使用方法は、操作が簡便であり、またストレプトコッカス・ミュータンスの菌体表面に存在する複数種の抗原と反応する複数種の抗体を同時に除去することが可能であるということから、より好適である。この時、使用する菌体は、例えばストレプトコッカス・ミュータンスの標準菌株をBHI液体培地で培養することにより容易に調製できる。菌体としては生菌をそのまま使用することも出来るし、加熱処理、ホルマリン処理等により調製した死菌も同様に使用可能である。また、ストレプトコッカス・ミュータンスの標準菌株としては、血清型c、e、fのいずれも使用可能であり、これらの混合物も使用可能であるが、血清型c又はeを使用するのが好適である。この場合において、前記したように原料抗体のS/M結合選択性を100以上、好ましくは1000以上にするには、親和定数の高い抗体のみならず、親和定数の低い抗体も充分除去する必要がある、そのためには、上述したように、1mgの原料抗体に、40OD₆₀₀以上の菌体を添加するのが好適である。

アフィニティー精製法における前記M抗原固定化担体と原料抗体の接触および分離法としては所謂バッチ法およびクロマトグラフィー法の何れの方法も使用可能である。また、両方法を組み合わせて実施することも可能である。

クロマトグラフィー法では、M抗原固定化担体をカラムに充填後、原料抗体をカラムに添加し、保持されず溶出する画分を分取すればよい。また、バッチ法においては、M抗原固定化担体を懸濁した液と原料抗体を混合し、抗原抗体反応を十分行わせた後に、例えば遠心処理により上清を回収することで実施できる。

ストレプトコッカス・ミュータンスの菌体をそのまま使用方法の原料抗体

との接触および分離法は、上記バッチ法と同様であり、菌体懸濁液と原料抗体を混合し、抗原抗体反応を十分行わせた後に、例えば遠心処理により上清を回収することで実施できる。

5 本発明者らはこの様な方法により、S/M結合選択性100以上のポリクローナル抗体として、ウサギ由来のポリクローナル抗体である $\alpha 6715$ 、 $\alpha B13$ 、及び $\alpha 6715-B13$ を取得した。

また、アフィニティー精製法により交差反応性抗体を分離する別の方法として、
10 ストレプトコッカス・ソブリヌスに特異的な菌体表面抗原を固定化した不溶性担体（以下、「S抗原固定化担体」ともいう。）と原料抗体とを接触させ、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能の高い抗体を吸着させ、吸着された抗体をpH、イオン強度又は誘電率を変化させる等従来公知の方法で遊離することにより、S/M結合選択性100以上の抗体を得ることもできる。この場合も、バッチ法またはクロマトグラフィー法のどちらも好適に使用することが出来る。

15 交差反応性抗体を除去した後のポリクローナル抗体中には、菌体由来の成分が混入している場合があるため、抗体画分に精製することが好ましい。精製方法としては塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法等の公知の方法が制限なく使用できるが、操作の簡便性および抗体画分を特異的に回収出来ることからプロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィー法を採用するのが特に好適である。

20 上記のようにして取得した各種S抗体は、それぞれ単独で使用する事もできるが、性質の異なる抗体を混合して使用する事もできる。例えば、ストレプトコッカス・ソブリヌスの血清型d株に対する反応性が血清型g株に対する反応性の2倍以上の抗体と、血清型g株に対する反応性が血清型d株に対する反応性の2倍以上の抗体を適宜混合して、血清型d及びg株に対する反応性を同等として用いることも可能である。
25

本発明の測定方法では、S抗体とストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体（以下、「M抗体」ともいう。）を併用して、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンス量

を同時に測定することもできる。

ここで、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体（M抗体）とは、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して高い結合能を示し、他の口腔内細菌、特にストレプトコッカス・ソブリヌスを含む他の口腔内レンサ球菌に対してはバックグラウンド以下の結合能しか示さない抗体を指す。なお、該抗体におけるグロブリンクラスは特に限定されず、現在知られているどのようなグロブリンクラスのものも含まれる。更に、通常の抗体分子のみならず、該抗体の部分分解物（F a b、F a b'、F a b' 2等）、及び該抗体の活性フラグメント（抗体の抗原認識部位）が存在する部分構造等も含まれる。

このような抗体は公知であり、具体例として、特開平10-36400号記載のモノクローナル抗体を例示することができるが、上記のような性質を満たす抗体であれば特に限定されず、公知の方法で作製したポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体が何ら制限なく使用できる。例えば、上記抗体がポリクローナル抗体である場合には、免疫動物にストレプトコッカス・ミュータンスの全菌体または該全菌体より得られる抗原抽出物を免疫してストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体を得、次いで得られた該ポリクローナル抗体から他の口腔内細菌との交差反応性を有するポリクローナル抗体を除去することにより好適に得る事ができる。尚、交差反応性を有するポリクローナル抗体を除去する方法は、吸着用抗原としてストレプトコッカス・ミュータンス以外の菌体等を使用すること以外、前記S抗体の取得方法におけるアフィニティー精製法と同様の方法により実施可能である。

また、本発明の測定方法では、S抗体とストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して特異的に結合する抗体（以下、「MS抗体」ともいう。）を併用することにより、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量を同時に測定することもできる。

ここで、ストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに特異的に結合する抗体（MS抗体）とは、ストレプトコッカス・ミュータ

5 ス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して高い免疫反応性を示し、他の
口腔内細菌に対してはバックグラウンド以下の免疫反応性しか示さない抗体を指
す。被検体液中のストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・
ソブリヌスの総量を定量するためには、抗体のストレプトコッカス・ミュータ
10 スとストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能が同等であることが好まし
い。ここで、ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリ
ヌスに対する免疫反応性（または結合能もしくは単に反応性ともいう）が同等で
あるとは、従来公知の免疫学的測定方法により、同一菌体量のストレプトコッカ
15 ス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原とし、免疫複合体の
検出を行った際に、両者からの検出値の割合が、相互に2倍以内、好ましくは1.
5倍以内であることを指す。

 該抗体としては、上記性質を満たす抗体であれば従来公知の方法で作製したポ
リクローナル抗体及びモノクローナル抗体が何ら制限なく使用できる。また、性
質の異なる抗体を混合して使用する事もできる。例えば、前記のM抗体とS抗体
15 を適宜混合して、ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソ
ブリヌスに対する反応性を同等として用いることも可能である。

 このようにして得られたS抗体及び必要に応じて、M抗体又はMS抗体を一緒
に用いて免疫学的測定方法により被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス
量、並びに必要に応じてストレプトコッカス・ミュータンス量又はストレプトコ
20 カス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスの総量を測定する方
法は特に限定されず、抗原抗体反応を介して抗原を測定する方法として知られてい
る免疫凝集法、光学免疫測定法、標識免疫測定法、およびこれらの組合わせ等の
従来公知の免疫学的測定方法が使用出来る。なお、これらの免疫学的測定は、S
抗体及び必要に応じて、M抗体又はMS抗体を含む免疫学的測定試薬を用いて好
25 適に行なうことができる。これら免疫学的測定試薬は、S抗体及び必要に応じて、
M抗体又はMS抗体を含む免疫学的測定試薬であればその形態は特に限定されず、
該試薬に使用される上記抗体（使用抗体）を含む溶液；使用抗体を粒子やメンブ
レン等の不溶性担体に固定化したもの或いはこれらの懸濁液；使用抗体に放射性

物質、酵素、各種色素類、コロイド類、各種粒子等の各種標識物質を結合させたもの、或いはその溶液や懸濁液；又はこの様な標識された使用抗体を粒子やメンブレン等の不溶性担体に固定化したもの或いはそれらの懸濁液；及びこれらを組み合わせたもの等、様々な形態をとり得る。

5 以下、これら免疫学的測定試薬を用いた測定方法について説明する。

 〈免疫凝集法〉

 該方法は、抗原抗体反応に基づく不溶性担体の凝集反応を利用して、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを検出、定量する方法である。半定量的方法としてはラテックス凝集法、マイクロタイター法等が、定量的測定法としては
10 ラテックス定量法等がある。

 例えばラテックス凝集法を利用して被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを免疫学的に測定する場合には、ラテックスビーズにS抗体を固定化した抗体感作粒子（S抗体感作粒子ともいう。）からなる測定試薬を作製後、該測定試薬と被検体液を混合し、抗原抗体反応後における感作粒子の凝集の度合を、目視、
15 或いは光学的測定法等により検出することで測定することが出来る。

 このとき、ラテックスビーズにM抗体又はMS抗体を固定化した抗体感作粒子（それぞれM抗体感作粒子及びMS抗体感作粒子ともいう。）からなる測定試薬を別途作製し、上記S抗体感作粒子の懸濁液とM抗体感作粒子又はMS抗体感作粒子の懸濁液を別々の試験管に入れ、更にこれら試験管に同一被検体液由来の被
20 検体液を入れて混合し、抗原抗体反応後における各感作粒子の凝集度合を、目視、或いは光学的測定法等により同一被検体液中のストレプトコッカス・ミュータンス量又はストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスとの総量を合わせて測定することが出来る。

 〈光学免疫測定法〉

25 該方法は、S抗体と被検体液とを接触させて抗原抗体反応を行った場合に、抗原抗体反応の結果生じる凝集物の濁度の変化を検出する方法、S抗体を透明な支持体上に固定化した測定試薬に被検体液を接触させ、抗原抗体反応の結果粒子状の菌体が透明支持体上に反応することによる透過度の変化を検出する方法、又は

S抗体を固定化した薄層（以下、抗体層ともいう。）に被検体液を接触させ、抗原抗体反応の結果生じる抗体層の屈折率の変化を透過光や表面プラズモン波等の変化として検出する方法等、抗原抗体反応の有無を光学的に検出する方法のことである。

5 〈標識免疫測定法〉

該方法では、S抗体に放射性物質、酵素、各種色素類、コロイド類、各種粒子等の各種標識物質を反応させて得た標識抗体を含む測定試薬と、被検体液とを接触させて抗原抗体反応を行った後に、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスに反応した標識物質の量、すなわち標識物質に由来する放射活性、酵素活性、
10 蛍光強度、着色等を測定することによって、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを検出、定量することができる。また、S抗体を固定化した不溶性担体（粒子、メンブレン、ELISAプレート等）からなる測定試薬と被検体液とを接触させて抗原抗体反応を行った後に、S抗体を標識物質で標識した標識抗体を含む別の測定試薬を接触させて更に抗原抗体反応を行った後に、標識物質の量
15 を測定することによって、又は被検体液と標識物質で標識したストレプトコッカス・ソブリヌスの菌体または菌体表面抗原とを混合し、S抗体を固定化した不溶性担体からなる測定試薬に接触させて抗原抗体反応を行った後に、S抗体に反応した標識物質の量を測定することによって被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを検出、定量することができる。

20 標識物質としては、放射性物質として放射性ヨード、放射性炭素等が；酵素としてペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ等が；各種色素類として、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミン等の蛍光色素類が；コロイドとして金コロイド、炭素コロイド等が；各種粒子としては着色ラテックス粒子等が使用出来る。なお、酵素標識を行う場合は、チオール基とマレイミド基、アミノ基とアルデヒド基等の共有反応により直接標識する、
25 或いはビオチン-アビジン複合体を介し標識する等の方法が使用可能である。また、標識酵素としてアルカリホスファターゼ及びパーオキシダーゼを使用し、さらに前者の酵素の場合にはジオキセタン誘導体等の化学発光物質を、また後者の

酵素の場合にはルミノール誘導体等の化学発光物質を酵素の基質として使用した場合には、該基質の発光を検出することも出来る。

該標識免疫測定法では、用いる標識に応じて従来使用されている方法が特に限定無く使用できるが、中でも放射性物質を標識として使用する放射免疫測定法；
5 酵素を標識として使用する酵素免疫測定法；色素、特に蛍光色素を標識として利用する蛍光免疫測定法；酵素の基質としての化学発光物質を標識として利用する化学発光免疫測定法等は定量性が高いので、高精度の定量測定を行なう場合にはこれら測定方法を採用するのが好適である。また、コロイドまたは各種粒子を標識として使用するフロースルー免疫測定法、免疫クロマト法、及び免疫濾過法；
10 並びにラテックス凝集法は、操作が簡便であるという特徴がある。

これら各種免疫学的測定方法のなかでも、ラテックス定量法や酵素免疫測定法は、自動分析装置を用いて多数の被検体液を処理することが可能であるので、集団検診等の検査法として好適である。また、フロースルー免疫測定法、免疫クロマト法、およびラテックス凝集法は簡便性に加えて特別な知識や装置を必要とすることなく迅速な測定が可能であり、歯科医院や家庭においても実施可能であるため、汎用的な検査方法として好適である。
15

これら各種標識免疫測定法における操作、手順等は一般に採用されているそれらと特に異ならず、公知の非競合法や競合法、サンドイッチ法等に準じることが出来る。また、本発明で使用する前記の抗体と共に、上記の各標識物質で標識した二次抗体、プロテインA等の本発明で使用する前記抗体に反応可能な物質を使用してストレプトコッカス・ソブリヌスの検出・定量に用いることもできる。
20

また、必要に応じて複数の抗体を組み合わせることでストレプトコッカス・ソブリヌスの検出、定量に用いることも出来る。例えば、サンドイッチ法の原理に基づく免疫学的測定方法に於いて、固相に固定化する抗体としてモノクローナル抗体を使用し、標識抗体としてポリクローナル抗体を使用することもできる。
25

例えばフロースルー免疫測定法を利用して被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを測定する場合には、S抗体をストレプトコッカス・ソブリヌス捕捉用抗体として多孔性膜上に固定化して測定試薬を得、次いで、該多孔性膜表面

に被検体液を接触させた後、多孔性膜表面に垂直方向に被検体液を通過させ、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを多孔性膜に抗原抗体反応により捕捉し、更に、標識したS抗体の溶液からなる別の測定試薬を多孔性膜表面に接触させた後、多孔性膜表面に垂直方向に通過させ、多孔性膜上の標識抗体の有無または多寡を測定することで、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを迅速、簡便に測定することが出来る。

該標識免疫測定法では、S抗体及び、M抗体又はMS抗体を含む測定試薬を用いることにより、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量と、ストレプトコッカス・ミュータンス量又はストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスとの総量とを同時に測定することもできる。このことにより、結果として従来の培養法による測定と同様に口腔内に存在するミュータンスレンサ球菌のほぼ全量を併せて知ることができ、従来法との対応を確認することが可能となる。

上記のS抗体及び、M抗体又はMS抗体を含む測定試薬を用いた測定は、S抗体とM抗体又はMS抗体とをそれぞれ異なる標識物質と反応させて得た標識抗体を含む測定試薬と、被検体液とを接触させて抗原抗体反応を行った後に、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスに反応した標識物質の量、及び被検体液中のストレプトコッカス・ミュータンスに反応した標識物質の量又はストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスとの両方に反応した標識物質の量を区別して同時に測定すればよい。また、S抗体及びM抗体又はMS抗体を同一の不溶性担体（メンブレン、ELISAプレート等）の異なる位置に固定化した測定試薬を使用し、被検体液と接触させて抗原抗体反応を行った後に、S抗体とM抗体又はMS抗体とを標識物質と反応させて得た標識S抗体及び標識M抗体又は標識MS抗体からなる別の測定試薬を接触させて更に抗原抗体反応を行った後に、不溶性担体に反応した標識物質の量を測定することもできる。さらに、被検体液と標識物質で標識したストレプトコッカス・ソブリヌスの菌体または菌体表面抗原、及び標識物質で標識したストレプトコッカス・ミュータンスの菌体または菌体表面抗原とを混合し、S抗体及びM抗体又はMS抗体を固定

化した不溶性担体からなる測定試薬に接触させて抗原抗体反応を行った後に、S抗体及びM抗体又はMS抗体に反応した標識物質の量を同時に測定することによって実施可能である。このとき、それぞれの抗体を別個に固定化した不溶性担体を並列して使用することも可能であるし、同一の不溶性担体の異なる位置にそれぞれの抗体を固定化したものを使用することもできる。

例えばフロースルー免疫測定法を利用して被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンス量を同時に測定する場合には、S抗体をストレプトコッカス・ソブリヌス捕捉用抗体として、またM抗体をストレプトコッカス・ミュータンス捕捉用抗体として、それぞれ多孔性膜上の区別可能な位置に固定化して測定試薬を得、次いで、該多孔性膜表面に被検体液を接触させた後、多孔性膜表面に垂直方向に被検体液を通過させ、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを多孔性膜に抗原抗体反応によりそれぞれ区別される位置に捕捉し、更に、それぞれ同一又は別の標識物質により標識したS抗体及びM抗体の溶液を多孔性膜表面に接触させた後、多孔性膜表面に垂直方向に通過させ、多孔性膜上のそれぞれ区別される位置上の標識抗体の有無または多寡を同時に測定することで、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンス量を同時に、且つ迅速、簡便に測定することが出来る。また、S抗体及びMS抗体を含む試薬を用いて同様の操作によりストレプトコッカス・ソブリヌス量とストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量とを同時に測定することもできる。

前記したように免疫クロマト法は、歯科医院や家庭においても実施可能な方法であるが、本発明者らは、該方法で一般的に使用される免疫クロマト法ストリップ（単に、ストリップとも言う。）と呼ばれる測定試薬にS抗体を用いることによりその検出限界を高め、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを高感度で測定することに成功した。このことにより、上記S抗体を用いたストリップを使用した免疫クロマト法（以下、本発明の免疫クロマト法ともいう。）は、優れた汎用的な齲蝕危険度の判定検査方法となり得る。そこで、以下に図を参照し

て該方法について詳しく説明する。

図2に本発明の免疫クロマト法で好適に使用できる代表的なストリップ1の構造を、又図1には該ストリップ1の各部材の該略図を示す。該ストリップ1は、従来のストリップと同様に、それぞれ目的に応じた多孔性支持体からなる各部材、すなわち被検体液を一時的に吸収、保持するためのサンプルパッド2、標識抗体を一時的に保持するためのコンジュゲートパッド3、検出用抗体が固定化される展開メンブレン4、およびサンプルパッド2より展開された被検体液を吸収するための吸収パッド5がこの順番で接合された構造からなる。ストリップ1におけるコンジュゲートパッド3には、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを標識するための抗体（以下、「標識抗体」という。該標識抗体としては、例えば金コロイド等の標識物質で標識したS抗体が使用できる。）が塗布・乾燥することにより保持されており、また、上記展開メンブレン4上の検出ライン6には、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスを捕捉するための検出用抗体としてS抗体が固定化されている。なお、図1及び図2中に示される各寸法（長さ）は、単に大きさの目安を示すものであり、本発明の免疫クロマト法で使用するストリップの大きさは、これら図に示される値に限定されるものではない。

上記各部材を構成する多孔性支持体に用いる材料は特に限定されず、各部材の目的に応じて吸湿性材料、多孔質材料、繊維質材料等から適宜選択される。例えば、サンプルパッド2としては、濾紙、吸収紙等を用いるのが好適であり、コンジュゲートパッド3としてはガラス繊維布、ポリプロピレン不織布、ガラスフィルター等を用いるのが好適である。また展開メンブレン4としてはニトロセルロース、或いは酢酸セルロースを含むニトロセルロース等を用いるのが好適であり、吸収パッド5としては濾紙、吸収紙等を用いるのが好適である。

なお、検出用抗体及びコントロール抗体の展開メンブレン4への固定化方法は特に限定されず、従来公知の物理的吸着法や共有反応法が何ら制限無く使用出来るし、他のタンパク質等と混合して固定化することも出来る。また、展開メンブレンへの被検体液成分の非特異的吸着を抑制する、或いは展開メンブレンへの被検体液の湿潤性を向上するため抗体固定化後の展開メンブレンを公知の方法によ

りタンパク質、脂質、高分子化合物等によりブロッキング処理することも出来る。
このブロッキング処理に用いるタンパク質等は特に限定されるものではないが、
一般的な免疫学的測定法において、非特異的反応を抑制する目的で使用されてい
るBSA、スキムミルク等が好適である。また、被検体液が展開メンブレンを均
5 一に展開するように、展開メンブレンの吸水性を調整するために、展開メンブレン
の表面に親水性重合体や界面活性剤を被覆または含浸させることも出来る。

なお、コンジュゲートパッド3については、被検体液を添加したときに、スト
レプトコッカス・ソブリヌスと標識抗体との複合体が、この部分から容易に脱離
するように、水溶性重合体、またはサッカロース等の糖類で予めブロッキングし
10 た後標識抗体を添加してから乾燥させる、或いは標識抗体を予め水溶性重合体、
またはサッカロース等の糖類と混合してからコンジュゲートパッドに塗布し乾燥
させるのが好ましい。上記水溶性重合体としては、ポリビニルピロリドン、ポリ
ビニルアルコール、ポリエチレングリコール、セルロースエーテル（メチルセル
15 ロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセ
ルロース、オキシエチルセルロース、シアンエチルセルロース等）、ゼラチン等
が使用できる。

また、標識抗体を調製するための標識物質としては、金コロイド、炭素コロイ
ド、着色ラテックス等の目視によって確認できる標識物が使用出来る他、放射性
物質や蛍光物質も使用可能である。また、標識物質として酵素を利用し、抗原抗
20 体反応の後に基質を添加して、酵素反応により生じる化合物を検出することも出
来る。抗体の標識化は特に限定されず、従来一般的に採用されている方法により
行なうことができる。

本発明の免疫クロマト法では、前記ストリップ1のコンジュゲートパッド3の
近傍に位置するサンプルパッド2に被検体液を添加し、室温で1～30分間放置
25 することにより被検体液とともに標識抗体を検出ライン6まで展開し、サンドイ
チ法の原理に基づいて、展開液中の標識抗体と反応したストレプトコッカス・ソ
ブリヌスを検出用抗体にて検出ライン6上に捕捉し、捕捉されたストレプトコ
ッカス・ソブリヌスに反応した標識抗体を検出することにより、被検体中のストレ

プトコッカス・ソブリヌスの有無またはその多寡を測定することが出来る。このときに標識抗体が被検体液と共に正常に展開されていることは、上記検出ライン6の上流のコントロール判定ライン7に標識抗体と反応する抗体を固定化しておき、この位置で標識抗体が検出されることにより確認することができる。なお、
5 図1に示される展開メンブレン4上の検出ライン6及びコントロール判定ライン7の位置、順、形状、数等は一例であり特に限定されるものではない。

以上、標識抗体を予め塗布して乾燥させたストリップを用いた免疫クロマト法について説明したが、標識抗体を予め被検体液と混合し抗原抗体反応を行わせた後に、該混合液を検出用抗体が固定化された多孔性支持体の一端に添加するとい
10 う方法でも測定可能である。

また、本発明の免疫クロマト法においては、図3に示すようなコンジュゲートパッド3に標識抗体として、金コロイド等の標識物質で標識したS抗体（標識S抗体）及びM抗体（標識M抗体）が塗布・乾燥することにより保持され、また、上記展開メンブレン4上の検出ライン6 a及び6 bに検出用抗体としてそれぞれ
15 S抗体及びM抗体が固定化されたストリップを用いることにより、上記と同様な原理により、被検液中のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスの量を同時に測定することもできる。なお、図3には検出ライン6 a及び検出ライン6 bが展開メンブレン4の被検体液が展開される下流側の端部から展開方向に異なる距離になるようにライン状（帯状）に直列的に配置
20 された態様を示したが、各検出用抗体の固定化位置、固定化部分の大きさ、形状は特に限定されるものではない。例えば、図4に示されるように展開メンブレン4上の検出ライン6の位置に、S抗体及びM抗体を、展開メンブレン4の被検体液が展開される下流側の端部から展開方向に同じ距離になるように並列に、円状或いはスポット状に固定化してもよい。また、両抗体が固定化される部分は完全
25 に分離される必要はなく、交互に交差した形状等、目視にて容易に識別可能な任意の形状、位置関係とすることが可能である。

また、上記した図3及び図4に示したような展開メンブレン4を用いた各ストリップにおいて検出用抗体および標識抗体として使用するM抗体に変えてMS抗

体を使用することにより被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量とストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスとの総量を同時に測定することもできる。

- 5 本免疫クロマト法による測定においては、例えば以下のような手順で測定を行なうことにより、迅速簡便に被験者の口腔内に存在するストレプトコッカス・ソブリヌスの量を知ることができ、齲蝕危険度を診断判定することができる。

- 即ち、まず、①口腔内より歯垢或いは唾液を採取（スパチュラ、又は綿棒で歯垢を採取、或いはスポイトで唾液を採取）し、②採取物が唾液である場合にはそのまま、或いは検体希釈液に懸濁させ、また、採取物が歯垢である場合には検体
10 希釈液に懸濁させた後必要に応じて超音波を当てる等の歯垢の分散処理を施して被検体液を調製し、③被検体液（例えば100～200 μ l）を分取し、前記ストリップのサンプルパッドに添加し、所定時間（例えば1～30分）静置した後、該ストリップの検出ライン6及びコントロール判定ライン7の着色の有無あるいはその状態により判定することによりストレプトコッカス・ソブリヌスが存在す
15 るか否か、或いはその量を知ることができる。

- 例えば、後述する実施例のようにして調製した被検体液について金コロイドを標識物質として用いて測定を行なった場合には、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度により検出ライン6の金コロイドによる着色の程度は表1
20 に示す様に変化するので、表2の基準に従い齲蝕危険度を診断判定することができる。なお、表2では特定の希釈倍率で調製した被検体液の菌体濃度を基準とした例を示したが、被検体液調製時の希釈倍率から歯垢又は唾液の単位量当たりの菌体濃度を換算し、これを判定基準としてもよいことは勿論である。

表1

25

ストレプトコッカス・ソブリヌス菌数(個/ml)	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	<10 ⁵
検出ラインの色	濃赤色	赤色	薄赤色	無色
判 定	+++	++	+	—

表2

検出ライン	コントロールライン	判定	齧蝕危険度
濃赤色～赤色	赤色～濃赤色	+++～++	危険度が高い
赤色～薄赤色	赤色～濃赤色	++～+	危険度は中程度
薄赤色	赤色～濃赤色	+	危険度は低い
無色	赤色～濃赤色	—	危険度はない
薄赤色～濃赤色	無色	再検査	判定不可
無色	無色	再検査	判定不可

- 10 また、M抗体を併用し、金コロイドを標識物質として用いた図3に示すようなストリップを用い、上記と同様な手順で測定を行なった場合には、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスの濃度により、検出ライン6 a及び検出ライン6 bの金コロイドによる着色の程度は表3に示す様に変化するので、表4の基準に従いより高精度の齧蝕危険度を診断判定15 することができる。尚、表4における齧蝕危険度を示す指標AAA～Dは、それぞれ「AAA～A：危険度が高い」、「BB～B：危険度は中程度」、「C：危険度は低い」、「D：危険度はない」を意味する。

表3

ストレプトコッカス・ソブリヌス				
ストレプトコッカス・ソブリヌス菌数(個/ml)	10^7	10^6	10^5	$<10^5$
検出ラインの色	濃赤色	赤色	薄赤色	無色
判 定	+++	++	+	—
ストレプトコッカス・ミュータンス				
ストレプトコッカス・ミュータンス菌数(個/ml)	10^7	10^6	10^5	$<10^5$
検出ラインの色	濃赤色	赤色	薄赤色	無色
判 定	+++	++	+	—

表4

		ストレプトコッカス・ソブリヌス判定			
		+++~++	++~+	+	—
ストレプト コッカス・ ミュータン ス 判定	+++~++	AAA	AA	A	BB
	++~+	AA	A	BB	B
	+	A	BB	B	C
	—	A	B	C	D

また、MS抗体を併用し、金コロイドを標識物質として用いた図3に示すようなストリップを用い、上記と同様な手順で測定を行なった場合には、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスの濃度により、検出ライン6 a及び検出ライン6 bの金コロイドによる着色の程度は表5に示す様に変化するので、表6の基準に従いより高精度の齧蝕危険度を診断判定することができる。尚、表6における齧蝕危険度を示す指標AAA~Dは、表4におけるのと同じである。

このようにして免疫クロマト法により、齧蝕原因菌として特に重要であるストレプトコッカス・ソブリヌスの量、および必要に応じてストレプトコッカス・ミュータンス量、或いはストレプトコッカス・ミュータンス量とストレプトコッカス・ソブリヌスの総量を迅速簡便に測定することができ、被験者の齧蝕危険度を診断判定することができる。

表5

ストレプトコッカス・ソブリヌス				
ストレプトコッカス・ソブリヌス 菌数(個/ml)	10^7	10^6	10^5	$<10^5$
検出ラインの色	濃赤色	赤色	薄赤色	無色
判 定	+++	++	+	—
ストレプトコッカス・ミュータンス及び ストレプトコッカス・ソブリヌス				
ストレプトコッカス・ミュータンス 及びストレプトコッカス・ ソブリヌス総菌数(個/ml)	10^7	10^6	10^5	$<10^5$
検出ラインの色	濃赤色	赤色	薄赤色	無色
判 定	+++	++	+	—

表6

		ストレプトコッカス・ソブリヌス判定			
		+++~++	++~+	+	—
ストレプトコッカス・ミ ュータンスとストレプト コッカス・ソブリヌスの 総量の判定	+++~++	AAA	AA	A	BB
	++~+		A	BB	B
	+			B	C
	—				D

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例により限定されるものではない。

製造例1 ストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体の作製、抗体の反応性評価

(1) 菌体試料懸濁液の調製

BHI (DIFCO社) 3.7gを100mlの超純水に溶解後、オートクレーブ処理し、BHI液体培地を調製した。BHI液体培地2ml中で6715 (ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型g) を37℃、5時間、嫌気条件下 ($N_2 : H_2 : CO_2 = 80 : 10 : 10$) で培養した後、培養液を4000g、5分

遠心処理し、上清の培地成分を除去し菌体沈殿を回収した。次いで、沈殿物を5 mlのPBSに懸濁させて、同様の遠心分離をする操作を3回行い、沈殿物を洗浄した。その後得られた菌体沈殿をPBSに懸濁し、 $A_{600}=1.0$ に調整し菌体試料懸濁液とした。なお、該菌体試料懸濁液を超音波処理後、適宜希釈した後

5 にBHI培地プレート上に添加し、生じたコロニー数を計数し菌体試料懸濁液の希釈倍率を乗じることで該菌体試料懸濁液の菌体濃度を求めたところ、約 1×10^9 個/mlであった。

同様の操作により、B13 (ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型d)、Ingbritt (ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型c)、P4 (ス

10 トレプトコッカス・ミュータンス、血清型e)、OMZ175 (ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型f)、ATCC10556 (ストレプトコッカス・サンギス)、IFO14252 (ストレプトコッカス・サリバリウス)、ATCC49456 (ストレプトコッカス・ミティス)、ATCC35037 (ストレプトコッカス・オラリス)、Charis (ストレプトコッカス・ゴールドニー)

15 の菌体試料懸濁液を調製した。なお、ここで6715、B13、Ingbritt、Charis等は標準菌株の菌株名を、ATCC10556、IFO14252等は標準菌株の寄託番号を示す。

(2) ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する抗血清の作製

オートクレーブ処理したBHI液体培地100ml中で6715 (ストレプト

20 コッカス・ソブリヌス、血清型g)を37℃、5時間、嫌気条件下($N_2:H_2:CO_2=80:10:10$)で培養した。培養液を4000g、5分遠心処理し、上清の培地成分を除去し菌体沈殿を回収した。次いで、沈殿物を100mlのPBSに懸濁させて、同様の遠心分離をする操作を3回行い、沈殿物を洗浄した。菌体沈殿を回収、秤量し、10mg湿菌/mlの6715の菌体懸濁液を調製し

25 た。該菌体懸濁液を、5mg湿菌/mlとなるよう0.5%ホルマリン-PBSで倍希釈し菌体抗原懸濁液とし、懸濁状態で4℃にて保存した。

該菌体抗原懸濁液それぞれ各1mlを、1週間の内に1日毎に3回ウサギに対し耳介静脈注射した。同様の免疫操作を第2週、第3週と、計6回行った。更

に菌体抗原懸濁液 0.5 ml を等量のアジュバンドと混合し、ウサギの皮下に 2 回注射した。力価の上昇をスライドグラスを利用した菌体の凝集反応の程度により確認後、最終免疫より 1 週間後に、定法に従い採血しストレプトコッカス・ソブリヌスに対する抗血清を得た。

5 (3) ストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体の精製

(1) の方法に従い、Ingbritt (ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型 c)、P4 (ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型 e)、及び OMZ175 (ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型 f) をそれぞれ約 2×10^{10} 個/ml 含む菌体懸濁液 10 ml を調製した。

10 次いで該菌体懸濁液と、(2) で得られた抗血清 0.5 ml を混合し 4℃、60 分反応した。混合液を 4000 g、5 分遠心処理後上清を分取し、0.22 μ m フィルターで濾過した。

次いで、あらかじめ PBS で平衡化した 1 ml のプロテイン A-セファロース (ファルマシア社) を充填したカラムに上清試料を添加し、5 ml の PBS でカラムを洗浄後、5 ml の 0.1 M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 3.0) にて溶出し、直ちに 100 mM トリス-塩酸 (pH 9.0) を添加し pH 7.4 に調整した。IgG の溶出画分は、 A_{280} を測定することで確認した。0.5 ml の抗血清より、約 4 mg の IgG を回収した。

15 (4) 直接 ELISA 法によるストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体の評価

上記 (3) で精製したストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体 (以下「 $\alpha 6715$ 」と表記することもある) と、各菌体との反応性評価は、以下の直接 ELISA 法により行った。

すなわち、まず、上記 (1) の方法で得られた菌体試料懸濁液を、0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.0) にて $1 \times 10^4 \sim 10^9$ 個/ml となるよう希釈したものを、96 穴イムノプレート (Nunc 社、Maxisorp) の各ウェルに 50 μ l ずつ添加し、4℃、12 時間放置し固定した。イムノプレートから菌体懸濁液を除去し、300 μ l の PBS で 3 回洗浄した。

次いで、イムノプレートの各ウェルに、2%BSA-0.1M炭酸緩衝液(pH9.0)を300 μ l添加し、37℃、2時間放置した後、イムノプレートから2%BSA-炭酸緩衝液(pH9.0)を除去し、300 μ lの0.05%Tween20-PBS(pH7.4)で3回洗浄した。

5 次いで、 α 6715を、1%BSA-0.05%Tween20-PBS(pH7.4)にて1.0 μ g/mlとなるよう希釈し、イムノプレートの各ウェルに50 μ l添加し、37℃、1時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し、300 μ lの0.05%Tween20-PBS(pH7.4)で3回洗浄した。

10 次いで、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgG(Fc)ポリクローナル抗体(ヤギ)(カッペル社)を、1%BSA-0.05%Tween20-PBS(pH7.4)にて10 μ g/mlとなるよう希釈し、イムノプレートの各ウェルに50 μ l添加し、37℃、1時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し、300 μ lの0.05%Tween20-PBS(pH7.4)で3回洗浄した。

15 次いで、発色基質溶液として、p-ニトロフェニルリン酸の2-エタノールアミン水溶液(BIORAD社)を各ウェルに50 μ lずつ添加し、室温下20分反応した。反応後、0.4MのNaOHを各ウェルに50 μ lずつ添加し反応を停止し、405nmの吸光度を測定した。結果を表7に示す。

20

25

表7

菌株	菌種／血清型	菌数(個/ウェル)	A ₄₀₅	
5	B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10 ²	0.005
	B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10 ³	0.011
	B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10 ⁴	0.062
	B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10 ⁵	0.640
	B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10 ⁶	1.635
	B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10 ⁷	>2.000
10	6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10 ²	0.004
	6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10 ³	0.013
	6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10 ⁴	0.080
	6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10 ⁵	0.653
	6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10 ⁶	1.682
	6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10 ⁷	>2.000
15	Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10 ⁵	0.005
	Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10 ⁶	0.004
	Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10 ⁷	0.012
20	P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10 ⁵	0.004
	P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10 ⁶	0.003
	P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10 ⁷	0.010
	OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10 ⁵	0.004
	OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10 ⁶	0.006
	OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10 ⁷	0.013
25	ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	5×10 ⁷	0.004
	IF014252	ストレプトコッカス・サリバリウス	5×10 ⁷	0.003
	ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	5×10 ⁷	0.004
	ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	5×10 ⁷	0.006
	Charis	ストレプトコッカス・ゴールドニー	5×10 ⁷	0.007

(5) 競合ELISA法によるストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリ
クローナル抗体の評価

$\alpha 6715$ と、各菌体との反応性は、以下の競合ELISA法によっても評価した。

- 5 すなわち、先ず、上記(4)と同様にして、菌体を固定化し、BSAでブロッキングしたイムノプレートを作製した。次いで、イムノプレートの各ウェルに、 $\alpha 6715$ を $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含み、更にストレプトコッカス・ミュータンス、
10 或いはストレプトコッカス・ソブリヌスの菌体を $10^5 \sim 10^9$ 個/ ml 含む 1% BSA- 0.05% Tween 20-PBS (pH 7.4) 溶液 $50 \mu\text{l}$ を添加し、 37°C 、1時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し、 $300 \mu\text{l}$ の 0.05% Tween 20-PBS (pH 7.4) で3回洗浄した。

次いで、上記(4)と同様にして、アルカリホスファターゼ標識した抗ウサギ IgG抗体を添加した後、発色基質溶液を添加し、 405 nm の吸光度を測定した。結果を表8に示す。

表8

6715固定化量 (個/ウェル)	添加した菌株	菌株の添加量 (個/ウェル)	A_{405}
5×10^5	6715	5×10^7	0.018
5×10^5	6715	5×10^6	0.078
5×10^5	6715	5×10^5	0.184
5×10^5	6715	5×10^4	0.309
5×10^5	6715	5×10^3	0.325
5×10^5	6715	0	0.320
5×10^5	Ingbritt	5×10^7	0.293
5×10^5	Ingbritt	5×10^6	0.325
5×10^5	Ingbritt	5×10^5	0.319
5×10^5	Ingbritt	5×10^4	0.321
5×10^5	Ingbritt	5×10^3	0.320
5×10^5	Ingbritt	0	0.319

表7より、 5×10^5 個/ウェルから 5×10^7 個/ウェルの範囲において、同一菌体量のストレプトコッカス・ソブリヌスとストレプトコッカス・ミュータンスを抗原とし、抗原抗体反応の検出を行った際に、ストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として使用した場合に検出される反応が、ストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に検出される反応の100倍以上であることが分かる。さらに、 5×10^7 個/ウェルのストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用した場合に検出される反応と同一の反応が検出されるストレプトコッカス・ソブリヌスの抗原量は 5×10^4 個/ウェル以下であることから、 $\alpha 6715$ のストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性は、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する反応性の1000倍以上であることが分かる。

また、表8より、 5×10^7 個/ウェルのストレプトコッカス・ミュータンスを添加した場合に検出される阻害反応は、 5×10^5 個/ウェル以下のストレプトコッカス・ソブリヌスを添加した場合に検出される阻害反応と同等であり、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性が、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する反応性の100倍以上であることが分かる。

実施例1 ストレプトコッカス・ソブリヌス測定用免疫クロマト法ストリップの作製、評価

(1) 金コロイド標識されたストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナル抗体の調製

コロイド粒径が40nmの市販金コロイド溶液 (EY Laboratory) 10mlに100mMK₂CO₃を88 μ l添加し、pHを9.0に調製後、0.22 μ mフィルター処理した。金コロイド溶液の520nmの吸光度を測定したところ、 $A_{520}=1.0$ であった。

次いで、1mg/mlに調整した $\alpha 6715$ の2mMホウ酸緩衝溶液 (pH9.0) 64 μ lを、上記金コロイド溶液に攪拌しながら添加し、室温下5分放置した。次いで、10%スキムミルク-2mMホウ酸緩衝液 (pH9.0) を1.1ml攪拌しながら添加し (スキムミルク終濃度1%)、室温下30分放置した。次いで、反応溶液を10℃、10000g、30分遠心処理し、上清を除去後、

2 ml の 2 m M P B S (p H 7. 4) を添加し、下層の金コロイド画分を再懸濁した。該再懸濁した画分の 5 2 0 n m の吸光度を測定したところ、 $A_{520} = 4.$

9 であった。得られた金コロイド画分（以下、「金コロイド標識 $\alpha 6 7 1 5$ 」と表記することもある）は、4℃にて保存した。

5 (2) 免疫クロマト法ストリップの作製

ニトロセルロースメンブレン (MILLIPORE 社、Hi-Flow Membrane、SN、25 mm × 6 mm) からなる展開メンブレン 4 上の検出ライン 6 及びコントロール判定ライン 7 上に、それぞれ 1 mg / ml の $\alpha 6 7 1 5$ 及び抗ウサギ Ig G (H + L) ポリクローナル抗体 1 μ l をスポットし、インキュベーター内で 37℃、60 分乾燥し抗体を固定化した。該抗体固定化メンブレンを 1% スキムミルク - 0.01% Triton X 100 水溶液中で室温下、5 分振とうした。次いで、該メンブレンを 10 mM リン酸緩衝液 (p H 7. 4) 中で室温下、10 分振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら 60 分間デシケーター中で乾燥した。

また、コンジュゲートパッド 3 (MILLIPORE 社、7.5 mm × 6 mm) を 0.5% PVA - 0.5% ショ糖水溶液中で 1 分間振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら 60 分間デシケーター中で乾燥した。該コンジュゲートパッドに $A_{520} = 1.0$ に調整した金コロイド標識 $\alpha 6 7 1 5$ を 25 μ l 添加し、真空ポンプで吸引しながら 60 分間デシケーター中で乾燥した。更に、サンプルパッド 2 (MILLIPORE 社、17 mm × 6 mm) を 0.05% Tween 20 - P B S 水溶液中で 1 分間振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら 60 分間デシケーター中で乾燥した。尚、吸収パッド 5 (MILLIPORE 社、20 mm × 6 mm) は未処理のまま用いた。

このように調製した、図 1 に示すような免疫クロマト法ストリップの各構成部分をプラスチックの支持台上に配置し、図 2 に示すような免疫クロマト法ストリップを組み立てた。

(3) 免疫クロマト法ストリップの特異性、感度評価

免疫クロマト法ストリップのサンプルパッド 2 上に、標準菌体の P B S 懸濁液

100 μ lを添加し、10分後にスポットの有無を判定した。判定は、固定化抗体スポット上に捕捉された金コロイドの程度を前記表1に示した基準に基づき4段階（+++：強い陽性、++：陽性、+：弱い陽性、-：陰性）に目視で識別し、感度及び定量性を評価した。結果を表9に示す。

表9

菌株	菌種／血清型	被検体液菌濃度 (個/ml)	判定
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10 ⁷	+++
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10 ⁶	++
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10 ⁵	+
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10 ⁴	-
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10 ⁷	+++
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10 ⁶	++
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10 ⁵	+
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10 ⁴	-
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁹	-
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁹	-
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁹	-
ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	10 ⁹	-
IF014252	ストレプトコッカス・サリバリウス	10 ⁹	-
ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	10 ⁹	-
ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	10 ⁹	-
Charis	ストレプトコッカス・ゴールドニー	10 ⁹	-

比較例1 ストレプトコッカス・ミュータンスによる吸収処理をしない、ストレプトコッカス・ソブリヌスに対するポリクローナルの評価

まず、製造例1の(2)で得られたストレプトコッカス・ソブリヌスに対する抗血清を、ストレプトコッカス・ミュータンスの菌体による吸収処理をしないで、製造例1(3)の操作手順に従い、プロテインAカラム処理のみ行い、IgG画

分を調製した（以下、「未精製ポリクローナル抗体」と表記することもある）。
 次に、製造例 1（4）の操作手順に従い、未精製ポリクローナル抗体と菌体との反応性を直接 E L I S A 法により評価した。結果を表 1 0 に示す。

表 1 0

菌株	菌種／血清型	菌数(個/ウェル)	A ₄₀₅
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10 ⁵	0.657
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10 ⁶	1.689
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10 ⁷	>2.000
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10 ⁵	0.678
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10 ⁶	1.712
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10 ⁷	>2.000
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁵	0.206
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁶	0.521
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁷	0.823
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁵	0.184
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁶	0.460
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁷	0.735
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁵	0.128
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁶	0.316
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁷	0.494
ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	10 ⁷	0.008
IF014252	ストレプトコッカス・サリバリウス	10 ⁷	0.010
ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	10 ⁷	0.007
ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	10 ⁷	0.012
Charis	ストレプトコッカス・ゴールドニー	10 ⁷	0.014

また、実施例 1 の操作手順に従い金コロイド標識抗体を調製後、免疫クロマト法ストリップを作製し、菌体との反応性を評価した。結果を表 1 1 に示す。

表 1 1

菌株	菌種／血清型	被検体液菌濃度 (個/ml)	判定
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^7	+++
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^6	++
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^5	+
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10^4	-
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^7	+++
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^6	++
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^5	+
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10^4	-
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^8	+++
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^7	++
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10^6	+
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^8	++
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^7	+
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10^6	+
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^8	++
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^7	+
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10^6	-
ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	10^9	-
IF014252	ストレプトコッカス・サリバリウス	10^9	-
ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	10^9	-
ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	10^9	-
Charis	ストレプトコッカス・ゴールドニー	10^9	-

表 1 0 から、未精製ポリクローナル抗体のストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性は、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する反応性の 10 倍以下であることが分かる。また、表 1 1 から、未精製ポリクローナル抗体を用いた免疫クロマト法ストリップを用いた場合には、ストレプトコッカス・ミュータンス

スに対する反応が検出され、ストレプトコッカス・ソブリヌスの特異的に検出することは出来なかった。

実施例2 免疫クロマト法ストリップによる菌垢からのストレプトコッカス・ソブリヌスの検出

5 (1) 菌垢を含む被検体液の調製

120人より、口腔内を水で洗浄し唾液成分を除去後、スパチュラを用いて菌垢を採取した。菌垢を秤量後、1mg湿重量/mlとなるようPBSに懸濁し、20秒間、60Wで超音波処理することで菌垢を含む被検体液を得た。

(2) 培養法による菌垢試料溶液中のストレプトコッカス・ソブリヌスの定量

10 上記(1)の方法に従い得られた菌垢を含む被検体液を適宜希釈して、100μlをミチス・サリバリウス・バシトラシン(以下、「MSB」と表記することもある。)固体培地上およびBHI固体培地上に添加し、37℃、嫌気条件下、24時間培養した。MSBおよびBHI固体培地上に生じるコロニー数を計数し、被検体液の希釈率から、ミュータンスレンサ球菌濃度を個/mlとして算出した。

15 MSBおよびBHI培地上のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスの識別は、コロニーの形態学的分類、及び形態学的に識別不可能なコロニーに関しては、該コロニーを純粋培養後、ミュータンスレンサ球菌の血清型特異的な抗体を利用した免疫学的測定方法及び、糖発酵試験等の生化学的方法によりストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュー

20 タンスの同定を行った。

(3) 免疫クロマト法ストリップによる菌垢を含む被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスの測定

上記(2)の検討により、ストレプトコッカス・ソブリヌスが検出された8検体、及びストレプトコッカス・ソブリヌスが検出されず、ストレプトコッカス・ミュータンスが検出された5検体、及び両者とも検出されない1検体の被検体液

25 200μlについて、実施例2の(2)と同様の方法で作製した免疫クロマト法ストリップを用いストレプトコッカス・ソブリヌスの測定を実施した。免疫クロマト法ストリップに於ける10分後のスポット発色強度を前記表1に示した基準

に基づき識別し、4段階（+++：強い陽性、++：陽性、+：弱い陽性、-：陰性）に識別した結果と、（2）の培養法により得られたストレプトコッカス・ソブリヌス菌数とを比較した。結果を表12に示す。

5 表12

検体	培養法		免疫クロマト法
	ストレプトコッカス・ソブリヌス ($\times 10^5$ 個/ml)	ストレプトコッカス・ミュータンス ($\times 10^5$ 個/ml)	判定
1	138.0	122.0	+++
2	36.8	16.0	++
3	19.2	139.0	++
4	3.38	18.0	+
5	2.24	29.0	+
6	2.09	8.0	+
7	1.84	1.52	+
8	1.6	7.0	+
9	0.00	52.8	-
10	0.00	3.92	-
11	0.00	0.88	-
12	0.00	0.78	-
13	0.00	0.01	-
14	0.00	0.00	-

表12より、培養法により得られたストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度と
 相関し、ストレプトコッカス・ミュータンスの濃度とは相関しないスポット発色
 強度が得られた。本発明の免疫クロマト法ストリップにより、ストレプトコッカ
 ス・ソブリヌスを 10^5 個/ml以上の濃度で含む被検体液から、ストレプトコッカ
 ス・ソブリヌスをその濃度依存的に、特異的に検出可能であった。

製造例2 ストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体の

作製、抗体の反応性評価

(1) 菌体試料懸濁液の調製

製造例 1 (1) の方法に従い、Ingbritt (ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型 c) の菌体試料懸濁液を調製した。A₆₀₀=1.0 に調整した
5 該菌体試料懸濁液の菌体濃度を求めたところ、約 2×10^9 個/ml であった。

同様の操作により、B13 (ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型 d)、
6715 (ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型 g)、P4 (ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型 e)、OMZ175 (ストレプトコッカス・ミュータンス、血清型 f)、ATCC10556 (ストレプトコッカス・サンギス)、
10 IFO14252 (ストレプトコッカス・サリバリウス)、ATCC49456 (ストレプトコッカス・ミティス)、ATCC35037 (ストレプトコッカス・オラリス)、Charis (ストレプトコッカス・ゴールドニー) の菌体試料懸濁液を調製した。

(2) ストレプトコッカス・ミュータンスに対する抗血清の作製

15 製造例 1 (2) の方法に従い、10mg 湿菌/ml の Ingbritt の菌体懸濁液を調製した。該菌体懸濁液を、5mg 湿菌/ml となるよう 0.5% ホルマリン-PBS で倍希釈し菌体抗原懸濁液とし、製造例 1 (2) の方法に従いウサギに免疫することでストレプトコッカス・ミュータンスに対する抗血清を得た。

(3) ストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体の精製

20 (1) で調製した B13 (ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型 d)、6715 (ストレプトコッカス・ソブリヌス、血清型 g)、ATCC10556 (ストレプトコッカス・サンギス)、IFO14252 (ストレプトコッカス・サリバリウス)、ATCC49456 (ストレプトコッカス・ミティス)、ATCC35037 (ストレプトコッカス・オラリス)、Charis (ストレプトコッカス・ゴールドニー) をそれぞれ約 2×10^{12} 個/ml 含む菌体懸濁液 20ml と、
25 上記 (2) で得られた抗血清 0.5ml を混合し 4℃、60 分反応した。混合液を 4000g、5 分遠心処理後上清を分取し、0.22 μm フィルターで濾過した。

次いで、製造例1(3)の方法に従いプロテインA処理し、0.5mlの抗血清より約5mgのIgGを回収した。

(4) 直接ELISA法によるストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体の評価

5 上記(3)で精製したストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体(以下「 α Ingbritt」と表記することもある)と、各菌体との反応性評価は、以下の直接ELISA法により行った。

すなわち、まず、上記(1)の方法で得られた菌体試料懸濁液を、0.1M炭酸緩衝液(pH9.0)にて $1 \times 10^5 \sim 10^9$ 個/mlとなるよう希釈したものを、96穴イムノプレート(Nunc社、Maxisorp)の各ウェルに50 μ lずつ添加し、4℃、12時間放置し固定した。イムノプレートから菌体懸濁液を除去し、300 μ lのPBSで3回洗浄した。

15 次いで、イムノプレートの各ウェルに、2%BSA-0.1M炭酸緩衝液(pH9.0)を300 μ l添加し、37℃、2時間放置した後、イムノプレートから2%BSA-炭酸緩衝液(pH9.0)を除去し、300 μ lの0.05%Tween20-PBS(pH7.4)で3回洗浄した。

20 次いで、 α Ingbrittを、1%BSA-0.05%Tween20-PBS(pH7.4)にて1.0 μ g/mlとなるよう希釈し、イムノプレートの各ウェルに50 μ l添加し、37℃、1時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し、300 μ lの0.05%Tween20-PBS(pH7.4)で3回洗浄した。

25 次いで、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギIgG(Fc)ポリクローナル抗体(ヤギ)(カッペル社)を、1%BSA-0.05%Tween20-PBS(pH7.4)にて10 μ g/mlとなるよう希釈し、イムノプレートの各ウェルに50 μ l添加し、37℃、1時間放置した後、イムノプレートから溶液を除去し、300 μ lの0.05%Tween20-PBS(pH7.4)で3回洗浄した。

次いで、発色基質溶液として、p-ニトロフェニルリン酸の2-エタノールア

ミン水溶液（B I O R A D社）を各ウェルに50 μ l ずつ添加し、室温下20分反応した。反応後、0.4MのNaOHを各ウェルに50 μ l ずつ添加し反応を停止し、405 nmの吸光度を測定した。結果を表13に示す。

表 1 3

菌株	菌種／血清型	菌数(個/ウェル)	A ₄₀₅
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5 \times 10 ³	0.005
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5 \times 10 ⁴	0.018
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5 \times 10 ⁵	0.092
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5 \times 10 ⁶	0.736
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5 \times 10 ⁷	1.824
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5 \times 10 ³	0.004
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5 \times 10 ⁴	0.016
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5 \times 10 ⁵	0.081
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5 \times 10 ⁶	0.613
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5 \times 10 ⁷	1.475
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5 \times 10 ³	0.004
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5 \times 10 ⁴	0.010
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5 \times 10 ⁵	0.065
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5 \times 10 ⁶	0.455
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5 \times 10 ⁷	1.103
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5 \times 10 ⁵	0.002
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5 \times 10 ⁶	0.004
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5 \times 10 ⁷	0.010
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5 \times 10 ⁵	0.003
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5 \times 10 ⁶	0.004
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5 \times 10 ⁷	0.008
ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	5 \times 10 ⁷	0.004
IF014252	ストレプトコッカス・サリバリウス	5 \times 10 ⁷	0.003
ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	5 \times 10 ⁷	0.004
ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	5 \times 10 ⁷	0.008
Charis	ストレプトコッカス・ゴールドニー	5 \times 10 ⁷	0.010

表13より、 5×10^5 個/ウェルのストレプトコッカス・ミュータンスを抗原として使用し抗原抗体反応の検出を行った場合に、 5×10^7 個/ウェルの他の口腔内レンサ球菌を抗原として使用した場合よりも高い反応が検出されることから、 α Ingbrittのストレプトコッカス・ミュータンスに対する反応性は、他の口腔内レンサ球菌に対する反応性の100倍以上であることが分かる。

実施例3 ストレプトコッカス・ソプリヌスとストレプトコッカス・ミュータンスの同時測定用免疫クロマト法ストリップの作製、評価

(1) 金コロイド標識されたストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体の調製

実施例1(1)の方法に従い、 α Ingbrittの金コロイド標識物(以下、「金コロイド標識 α Ingbritt」と表記することもある)を調製し、4℃にて保存した。

(2) 免疫クロマト法ストリップの作製

ニトロセルロースメンブレン(MILLIPORE社、Hi-Flow Membrane、25mm×6mm)からなる展開メンブレン4上の検出ライン6の位置に、それぞれ1mg/mlの α 6715、 α Ingbritt1 μ lを、展開方向に対して並列にスポットし、コントロール判定ライン7上に1mg/mlの抗ウサギIgG(H+L)ポリクローナル抗体1 μ lをスポットし、インキュベーター内で37℃、60分乾燥し抗体を固定化した。該抗体固定化メンブレンを1%スキムミルク-0.1%TritonX100水溶液中で室温下、5分振とうした。次いで、該メンブレンを10mMリン酸緩衝液(pH7.4)中で室温下、10分振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら60分間デシケーター中で乾燥した。

また、コンジュゲートパッド3(MILLIPORE社、7.5mm×6mm)を0.5%PVA-0.5%ショ糖水溶液中で1分間振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら60分間デシケーター中で乾燥した。該コンジュゲートパッドに $A_{520}=2.0$ に調整した金コロイド標識 α 6715及び $A_{520}=2.0$ に調整した金コロイド標識 α Ingbrittをそれぞれ12.5 μ l添加し、真空

ポンプで吸引しながら60分間デシケーター中で乾燥した。更に、サンプルパッド2 (MILLIPORE社、17mm×6mm) を1% Tween 20-PBS水溶液中で1分間振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら60分間デシケーター中で乾燥した。尚、吸収パッド5 (MILLIPORE社、20mm×6mm) は未処理のまま用いた。

このように調製した、図4に示すような免疫クロマト法ストリップの各構成部分をプラスチックの支持台上に配置し、図2に示すような免疫クロマト法ストリップを組み立てた。

(3) 免疫クロマト法ストリップの特異性、感度評価

免疫クロマト法ストリップのサンプルパッド2上に、標準菌体のPBS懸濁液100 μ lを添加し、10分後にスポットの有無を判定した。判定は、固定化抗体スポット上に捕捉された金コロイドの程度を4段階(+++ : 強い陽性、++ : 陽性、+ : 弱い陽性、- : 陰性)に目視で識別し、感度及び定量性を評価した。結果を表14に示す。

表 1 4

	菌株	菌種／血清型	被検体液 菌濃度 (個/ml)	判定 検出ライン6a (ストレプトコッカス・ ソブリヌス検出)	判定 検出ライン6b (ストレプトコッカス・ ミュータンス検出)
5	B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10 ⁹	+++	-
	B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10 ⁸	+++	-
	B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10 ⁷	+++	-
	B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10 ⁶	++	-
	B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10 ⁵	+	-
	B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	10 ⁴	-	-
10	6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10 ⁹	+++	-
	6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10 ⁸	+++	-
	6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10 ⁷	+++	-
	6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10 ⁶	++	-
	6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10 ⁵	+	-
	6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	10 ⁴	-	-
15	Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁹	-	+++
	Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁸	-	++
	Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁷	-	+
	Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁶	-	+
	Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁵	-	-
	P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁹	-	+++
20	P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁸	-	++
	P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁷	-	+
	P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁶	-	+
	P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁵	-	-
	OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁹	-	+++
	OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁸	-	++
25	OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁷	-	+
	OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁶	-	-
	OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁵	-	-
	ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	10 ⁹	-	-
	IFO14252	ストレプトコッカス・サリバリウス	10 ⁹	-	-
	ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	10 ⁹	-	-
	ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	10 ⁹	-	-
	Charis	ストレプトコッカス・ゴールドニー	10 ⁹	-	-

表14より、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスの検出を行った際に、検出ライン6の位置のストレプトコッカス・ソブリヌス検出用スポットでは、 1×10^5 個/mlから 1×10^9 個/mlの範囲において被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスが特異的に検出されることが分かる。また、ストレプトコッカス・ミュータンス検出用スポットでは、Ingbritt（血清型c）及びP4（血清型e）を分析した場合に 1×10^6 個/mlから 1×10^9 個/mlの範囲において、またOMZ175（血清型f）を分析した場合に 1×10^7 個/mlから 1×10^9 個/mlの範囲において被検体液中のストレプトコッカス・ミュータンスが特異的に検出されることが分かる。ストレプトコッカス・ミュータンスの検出感度をストレプトコッカス・ソブリヌスの検出感度と同様に 10^5 個/mlとするためには、より反応性の高い抗体をとれば良い。そのような抗体の反応性としては、製造例2の（4）の直接ELISA法において、 5×10^3 個/ウェルのストレプトコッカス・ミュータンスを分析した場合に、バックグラウンド以上の反応が検出される程度の反応性を有する抗体が必要である。

実施例4 免疫クロマト法ストリップによる菌垢を含む被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンス量の同時測定

実施例2と同じ14検体の被検体液200 μ lについて、実施例3の（2）と同様の方法で作製した免疫クロマト法ストリップを用いストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンス量の同時測定を実施した。免疫クロマト法ストリップに於ける10分後のスポット発色強度を4段階（+++：強い陽性、++：陽性、+：弱い陽性、-：陰性）に識別した結果と、培養法により得られたストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンス菌数とを比較した。結果を表15に示す。

表 15

検体	培養法		免疫クロマト法	
	ストレプトコッカス・ソブリヌス ($\times 10^5$ 個/ml)	ストレプトコッカス・ミュータンス ($\times 10^5$ 個/ml)	判定(検出ライン6a) ストレプトコッカス・ソブリヌス検出	判定(検出ライン6b) ストレプトコッカス・ミュータンス検出
1	138.0	122.0	+++	++
2	36.8	16.0	++	+
3	19.2	139.0	++	++
4	3.38	18.0	+	+
5	2.24	29.0	+	+
6	2.09	8.0	+	+
7	1.84	1.52	+	-
8	1.6	7.0	+	+
9	0.00	52.8	-	++
10	0.00	3.92	-	-
11	0.00	0.88	-	-
12	0.00	0.78	-	-
13	0.00	0.01	-	-
14	0.00	0.00	-	-

表 15 より、ストレプトコッカス・ソブリヌス検出用スポットでは、培養法により得られたストレプトコッカス・ミュータンスの濃度に関わらずストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度と相関したスポット発色強度が得られた。また、ストレプトコッカス・ミュータンス検出用スポットでは、培養法により得られたストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度に関わらず、 7×10^5 個/ml 以上のストレプトコッカス・ミュータンスが検出された。本発明の同時測定用免疫クロマト法ストリップにより、ストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを 10^5 個/ml 以上の濃度で含む被検体液から、 10^5 個/ml 以上のストレプトコッカス・ソブリヌスをその濃度依存的に且つ特異的に、 7×10^5 個/ml 以上のストレプトコッカス・ミュータンスを特異的に同時検出可能

であった。

製造例3 ストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに反応するポリクローナル抗体の作製、抗体の反応性評価

製造例2で作製した10mgの α Ingbrittと製造例1で作製した1mgの α 6715とを混合し、ストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに反応するポリクローナル抗体（以下「 α Ingbritt-6715」と表記することもある）を作製した。 α Ingbritt-6715と各菌体との反応性評価を、製造例2（4）の方法に従い直接ELISA法により行った。結果を表16に示す。

10

15

20

25

表 16

菌株	菌種／血清型	菌数(個/ウェル)	A ₄₀₅
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10 ³	0.005
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10 ⁴	0.013
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10 ⁵	0.070
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10 ⁶	0.680
Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	5×10 ⁷	1.535
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10 ³	0.005
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10 ⁴	0.012
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10 ⁵	0.065
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10 ⁶	0.624
P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	5×10 ⁷	1.324
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10 ³	0.004
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10 ⁴	0.010
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10 ⁵	0.048
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10 ⁶	0.478
OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	5×10 ⁷	1.085
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10 ³	0.005
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10 ⁴	0.014
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10 ⁵	0.068
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10 ⁶	0.625
B13	ストレプトコッカス・ソブリヌス/d	5×10 ⁷	1.398
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10 ³	0.005
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10 ⁴	0.013
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10 ⁵	0.071
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10 ⁶	0.641
6715	ストレプトコッカス・ソブリヌス/g	5×10 ⁷	1.435
ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	5×10 ⁷	0.004
IF014252	ストレプトコッカス・サリバリウス	5×10 ⁷	0.003
ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	5×10 ⁷	0.004
ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	5×10 ⁷	0.006
Charis	ストレプトコッカス・ゴールドニー	5×10 ⁷	0.007

表16より、 5×10^5 個/ウェルのストレプトコッカス・ミュータンス或いはストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原として使用し抗原抗体反応の検出を行った場合に、 5×10^7 個/ウェルの他の口腔内レンサ球菌を抗原として使用した場合よりも高い反応が検出されることから、 α Ingbritt-6715のストレプトコッカス・ミュータンス或いはストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性は、他の口腔内レンサ球菌に対する反応性の100倍以上であることが分かる。また、 5×10^5 個/ウェルから 5×10^7 個/ウェルの範囲において、同一菌体量のストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスを抗原とし、抗原抗体反応の検出を行った際に、ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスより検出される反応が1.5倍以内であることから、 α Ingbritt-6715のストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスに対する反応性が同等であることが分かる。

実施例5 ストレプトコッカス・ソブリヌス量とストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌス総量の同時測定用免疫クロマト法ストリップの作製、評価

(1) 金コロイド標識されたストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに反応するポリクローナル抗体の調製

実施例1(1)の方法に従い、 α Ingbritt-6715の金コロイド標識物(以下、「金コロイド標識 α Ingbritt-6715」と表記することもある)を調製し、4℃にて保存した。

(2) 免疫クロマト法ストリップの作製

ニトロセルロースメンブレン(MILLIPORE社、Hi-Flow Membrane、25mm×6mm)からなる展開メンブレン4上の検出ライン6の位置に、それぞれ1mg/mlの α 6715、 α Ingbritt-6715 1 μ lを、展開方向に対して並列にスポットし、コントロール判定ライン7上に1mg/mlの抗ウサギIgG(H+L)ポリクローナル抗体1 μ lをスポットした。また、コンジュゲートパッド3に $A_{520}=2.0$ に調整した金コロイド標

識 $\alpha 6715$ 及び $A_{520} = 2.0$ に調整した金コロイド標識 α I n g b r i t t
- 6715 をそれぞれ $12.5 \mu l$ 添加した。上記以外の操作は実施例 1 (2)
の方法に従い、図 4 に示すような免疫クロマト法ストリップの各構成部分を調製
し、該各構成部分をプラスチックの支持台上に配置し、図 2 に示すような免疫ク
5 ロマト法ストリップを組み立てた。

(3) 免疫クロマト法ストリップの特異性、感度評価

免疫クロマト法ストリップのサンプルパッド 2 上に、標準菌体の P B S 懸濁液
 $100 \mu l$ を添加し、10 分後にスポットの有無を判定した。判定は、固定化抗
体スポット上に捕捉された金コロイドの程度を 4 段階 (++++ : 強い陽性、++
10 : 陽性、+ : 弱い陽性、- : 陰性) に目視で識別し、感度及び定量性を評価した。
結果を表 17 に示す。

15

20

25

表 17

	菌株	菌種／血清型	被検体液 菌濃度 (個/ml)	判定 検出ライン6a (ストレプトコッカス・ ゾプリヌス検出)	判定 検出ライン6b (ミュータンス及び ゾプリヌス総量検出)
5	B13	ストレプトコッカス・ゾプリヌス/d	10 ⁹	+++	+++
	B13	ストレプトコッカス・ゾプリヌス/d	10 ⁸	+++	++
	B13	ストレプトコッカス・ゾプリヌス/d	10 ⁷	+++	+
	B13	ストレプトコッカス・ゾプリヌス/d	10 ⁶	++	+
	B13	ストレプトコッカス・ゾプリヌス/d	10 ⁵	+	-
10	B13	ストレプトコッカス・ゾプリヌス/d	10 ⁴	-	-
	6715	ストレプトコッカス・ゾプリヌス/g	10 ⁹	+++	+++
	6715	ストレプトコッカス・ゾプリヌス/g	10 ⁸	+++	++
	6715	ストレプトコッカス・ゾプリヌス/g	10 ⁷	+++	+
	6715	ストレプトコッカス・ゾプリヌス/g	10 ⁶	++	+
15	6715	ストレプトコッカス・ゾプリヌス/g	10 ⁵	+	-
	6715	ストレプトコッカス・ゾプリヌス/g	10 ⁴	-	-
	Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁹	-	+++
	Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁸	-	++
	Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁷	-	+
20	Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁶	-	+
	Ingbritt	ストレプトコッカス・ミュータンス/c	10 ⁵	-	-
	P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁹	-	+++
	P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁸	-	++
	P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁷	-	+
25	P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁶	-	+
	P4	ストレプトコッカス・ミュータンス/e	10 ⁵	-	-
	OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁹	-	+++
	OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁸	-	++
	OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁷	-	+
	OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁶	-	-
	OMZ175	ストレプトコッカス・ミュータンス/f	10 ⁵	-	-
	ATCC10556	ストレプトコッカス・サンギス	10 ⁹	-	-
	IFO14252	ストレプトコッカス・サリバリウス	10 ⁹	-	-
	ATCC49456	ストレプトコッカス・ミティス	10 ⁹	-	-
	ATCC35037	ストレプトコッカス・オラリス	10 ⁹	-	-
	Charis	ストレプトコッカス・ゴールドニー	10 ⁹	-	-

表17より、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量の検出を行った際に、検出ライン6の位置のストレプトコッカス・ソブリヌス検出用スポットでは、 1×10^5 個/mlから 1×10^9 個/mlの範囲において被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスが特異的に検出されることが分かる。また、ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量検出用スポットでは、 1×10^7 個/ml或いは 1×10^6 個/mlから 1×10^9 個/mlのストレプトコッカス・ミュータンス或いはストレプトコッカス・ソブリヌスを含む被検体液において陽性反応が得られており、 1×10^9 個/mlの他の口腔内レンサ球菌を含む被検体液が陰性であることから、被検体液中のストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスが特異的に検出されることが分かる。

実施例6 免疫クロマト法ストリップによる菌垢を含む被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌス総量の同時測定

実施例2と同じ14検体の被検体液200 μ lについて、実施例5の(2)と同様の方法で作製した免疫クロマト法ストリップを用いストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌス総量の同時測定を実施した。免疫クロマト法ストリップに於ける10分後のスポット発色強度を4段階(+++：強い陽性、++：陽性、+：弱い陽性、-：陰性)に識別した結果と、培養法により得られたストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンス菌数とを比較した。結果を表18に示す。

表18

検体	培養法			免疫クロマト法	
	ストレプトコッカス・ソブリヌス ($\times 10^5$ 個/ml)	ストレプトコッカス・ミュータンス ($\times 10^5$ 個/ml)	ミュータンスとソブリヌス総量 ($\times 10^5$ 個/ml)	判定 検出ライン6a (ストレプトコッカス・ソブリヌス検出)	判定 検出ライン6b (ミュータンス/ソブリヌス 総量検出)
1	138.0	122.0	260.0	+++	+++
2	36.8	16.0	52.8	++	+
3	19.2	139.0	158.2	++	++
4	3.38	18.0	21.38	+	+
5	2.24	29.0	31.24	+	+
6	2.09	8.0	10.09	+	+
7	1.84	1.52	3.36	+	-
8	1.6	7.0	8.6	+	-
9	0.00	52.8	52.8	-	+
10	0.00	3.92	3.92	-	-
11	0.00	0.88	0.88	-	-
12	0.00	0.78	0.78	-	-
13	0.00	0.01	0.01	-	-
14	0.00	0.00	0.00	-	-

表18より、ストレプトコッカス・ソブリヌス検出用スポットでは、培養法により得られたストレプトコッカス・ミュータンスの濃度に関わらずストレプトコッカス・ソブリヌスの濃度と相関したスポット発色強度が得られた。また、ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌス総量の検出用スポットでは、該総量が 10^6 個/ml以上の場合に、特異的な反応が検出された。本発明の同時測定用免疫クロマト法ストリップにより、ストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量を 10^5 個/ml以上の濃度で含む被検体液から、 10^5 個/ml以上のストレプトコッカス・ソブリヌスをその濃度依存的に且つ特異的に、ストレ

プトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量が 10^6 個／ml 以上の場合に特異的な反応を同時検出可能であった。

産業上の利用可能性

- 5 本発明によれば、ストレプトコッカス・ミュータンスが混在する唾液又は歯垢を含む被検体液から培養法等を介さずに直接高感度でストレプトコッカス・ソブリヌスを測定することが出来る。特に免疫クロマト法、ラテックス凝集法、フロー
- 10 スルー免疫測定法を用いた本発明の測定方法によれば、歯科医院や家庭で迅速、且つ簡便にストレプトコッカス・ソブリヌスの測定を行うことが可能となる。また、ラテックス定量法、ELISA法を用いることで、迅速に多くの被検体液からストレプトコッカス・ソブリヌスを測定することも可能となる。更に本発明によれば、被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌス量及びストレプトコッカス・ミュータンス量（或いはストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの総量）を同時に測定することが出来る。このように、本発明により、新たな齲蝕危険度の診断システムを構築することも可能となる。
- 15 従って、本発明は、診断医療分野、並びに該医療分野で用いる試薬及びデバイスの製造業等において利用可能である。

20

25

請 求 の 範 囲

1. ストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを含むことが疑われる被検体液中のストレプトコッカス・ソブリヌスの検出方法
5 であって、
 (A) ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の100倍以上である抗体を用意すること、
 (B) 該抗体を被検体液と接触させて免疫複合体を形成すること、並びに
 (C) 該免疫複合体を測定すること、
10 を含んでなる方法。
2. ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の100倍以上である抗体がポリクローナル抗体である請求項1記載の方法。
3. ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能が、該細菌種の血清型d
15 及びg株に対するものであり、かつ血清型d及びg株に対する結合能が相互に2倍以内である請求項2記載の方法。
4. ストレプトコッカス・ソブリヌス及びストレプトコッカス・ミュータンスを含むことが疑われる被検体液が、 $10^5 \sim 10^7$ 個/mlの濃度でストレプトコッカス・ソブリヌスを含んでなる請求項1記載の方法。
- 20 5. 免疫複合体の測定が免疫クロマト法により実施される請求項1～4のいずれか一つに記載の方法。
6. 被験者における齲蝕の危険度の診断方法であって、
 (a) 被験者からの唾液及び／又は歯垢に由来する被検体液を調製すること、
 (b) ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の100倍以上である抗体を用意すること、
25 (c) 段階(a)で調製した被検体液と段階(b)で用意した抗体とを接触させて免疫複合体を形成すること、並びに
 (d) 該免疫複合体を測定し、その多寡を齲蝕の危険度の存否の指標として

評価すること、

を含んでなる診断方法。

7. ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・
ミュータンスに対する結合能の100倍以上である抗体がポリクローナル抗体で
5 ある請求項6記載の診断方法。

8. ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能が、該細菌種の血清型d
及びg株に対するものであり、かつ血清型d及びg株に対する結合能が相互に2
倍以内である請求項7記載の診断方法。

9. 被検体液が、 $10^5 \sim 10^7$ 個/mlの濃度でストレプトコッカス・ソブリ
10 ヌスを含んでなる請求項6記載の診断方法。

10. 段階(c)を該抗体(S抗体)の他にストレプトコッカス・ミュータンス
に対して特異的に結合する抗体(M抗体)の共存下を実施するか、或いは段階
(c)に加え、S抗体をM抗体に代えて実施すること以外は段階(c)と同様の
操作を実施し、こうして形成されるM抗体に由来する免疫複合体も測定し、該複
15 合体の多寡も齶蝕の危険度の存否の指標として評価する請求項6～9のいずれか
一つに記載の診断方法。

11. M抗体に代えてストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッ
カス・ソブリヌスに対して特異的に結合する抗体(MS抗体)を使用する請求項
10記載の診断方法。

12. 1種又は2種以上の免疫複合体の測定が免疫クロマト法により実施され
る請求項6～11のいずれか一つに記載の診断方法。

13. 被検体液が未処理の唾液である請求項6～12のいずれか一つに記載の
診断方法。

14. ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・
25 ミュータンスに対する結合能の100倍以上である抗体、さらに必要により、ス
トレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体、又はストレプ
トコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して特異的
に結合する抗体を含んでなる免疫学的測定用キット又は被験者における齶蝕の危

陰度の診断用キット。

15 15. 被検体液を一時的に吸収しそして保持するためのサンプルパッド、標識抗体を一時的に保持するためのコンジュゲートパッド、並びに検出用抗体が固定化され、前記サンプルパッドに一時的に吸収しそして保持された被検体液および
5 該被検体液に随伴して前記コンジュゲートパッドより流出した標識抗体が展開される展開メンブレンがこの順番で接合された免疫クロマトストリップにおいて、前記検出用抗体としてストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の100倍以上である抗体を用いることを特徴とする免疫クロマトストリップ。

10 16. 展開メンブレンに固定化される検出用抗体として、ストレプトコッカス・ミュータンスに対して特異的に結合する抗体、又はストレプトコッカス・ミュータンス及びストレプトコッカス・ソブリヌスに対して特異的に結合する抗体を併用することを特徴とする請求項15に記載の免疫クロマトストリップ。

15 17. ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能がストレプトコッカス・ミュータンスに対する結合能の100倍以上でるポリクローナル抗体。

18. ストレプトコッカス・ソブリヌスに対する結合能が該細菌種の血清型d及びg株に対するものであり、かつ血清型d及びg株に対する結合能が相互に2倍以内である請求項17記載のポリクローナル抗体。

20

25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 1

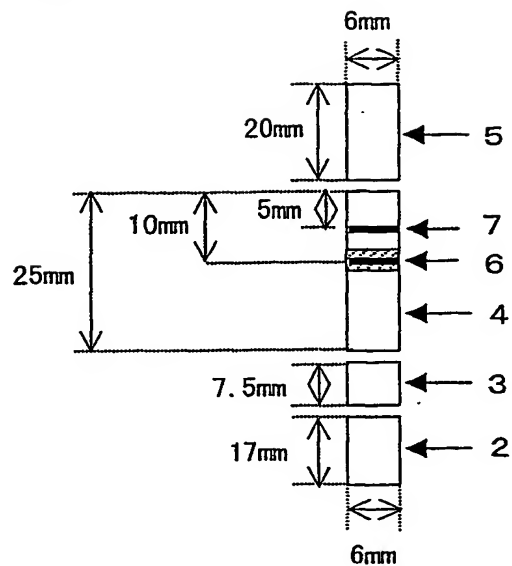
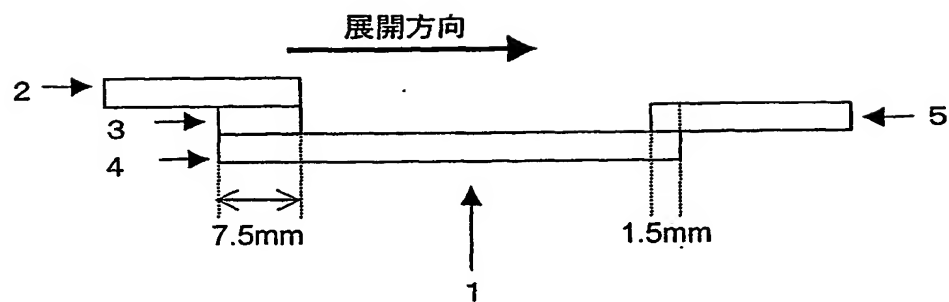


Fig. 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 3

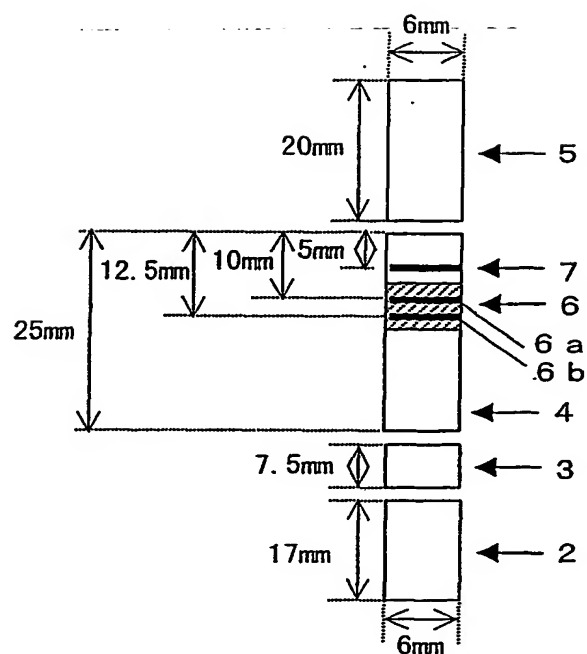
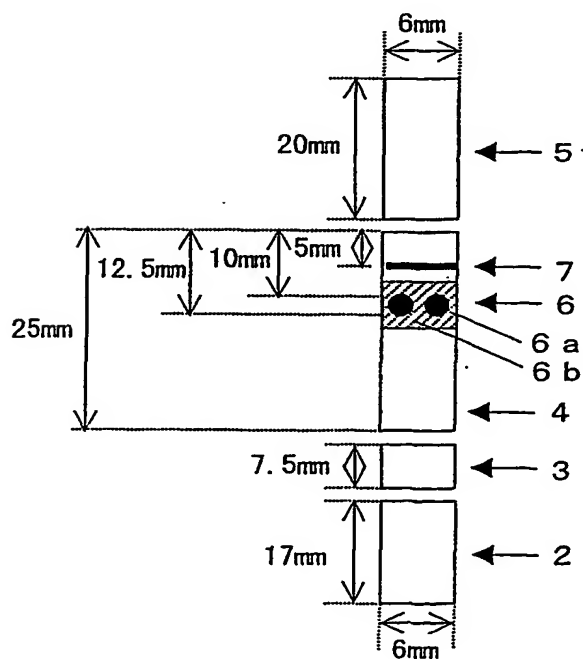


Fig. 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03502

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N33/569

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 1-250067 A (Lion Corp), 05 October, 1989 (05.10.89), (Family: none)	1-5, 14-18
A	Katsuhiko HIROTA, "Monoclonal Koutai wo Riyou shita Kouso Meneki Sokuteihou ni yoru Mutans Rensa Kyuukin no Jinsoku Kanben Sokuteihou", Shikoku Shishi, Vol.5, No.2, pp. 65-74	1-5, 14-18
A	Tsutomu TAKEI, "Latex Gyoushu Hannou wo mochiita Mutans Rensa Kyuukin no Tokuiteki Kenshutsu to Ushoku Katsudousei Shiken e no Ouyou", Handai Igaku Zasshi, 35 (1), pp.93-109, 1990	1-5, 14-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 July, 2001 (17.07.01)Date of mailing of the international search report
31 July, 2001 (31.07.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03502

B x I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6-13
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 6 to 13 pertain to diagnostic methods practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39 of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl⁷ G01N33/569

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl⁷ G01N33/569

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2001年
 日本国登録実用新案公報 1994-2001年
 日本国実用新案登録公報 1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 1-250067 A (ライオン株式会社) 5. 10月. 1989 (05. 10. 89) (ファミリーなし)	1-5, 14-18
A	弘田克彦「モノクロン抗体を利用した酵素免疫測定法によるミュータンスレンサ球菌の迅速簡便測定法」, 四国歯誌, 第5巻, 第2号, P65-74, (1992)	1-5, 14-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 07. 01

国際調査報告の発送日

31.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中靖典



2 J 9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	武井 勉「ラテックス凝集反応を用いたミュータンスレンサ球菌の特異的検出と齲蝕活動性試験への応用」阪大医学雑誌, 35 (1), P93-109、1990	1-5, 14-18

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 6-13 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲6-13は人の身体の診断方法を含むものであり、PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT規則39の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)